



**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

**INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL**

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE VÍRUS  
ENTÉRICOS (NOROVÍRUS, ASTROVÍRUS E ADENOVÍRUS) EM CRIANÇAS  
COM DIARREIA AGUDA EM ANGOLA**

**CARLA ALEXANDRA DIMAS TAVARES**

**Orientadora:** Professora Doutora Aida Esteves Simões

**Coorientadora:** Doutora Claudia Istrate

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do  
grau de Mestre em Ciências Biomédicas



## **Elementos Bibliográficos Resultantes da Dissertação**

---

**Tavares C., Esteves A., Mendes C., Nordgren J., Piedade J., Fortes F., Dimbu P.R, Saraiva N. e Istrate C.** *Detection and molecular characterization of noro, astro and adenoviruses circulating in children under five years of age in several regions of Angola.* 12<sup>th</sup> International Conference on Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases, Bangucoque, 11-13 de Dezembro de 2014 (Apresentação Oral).



## **Agradecimentos**

---

A realização deste trabalho só foi possível devido ao apoio incondicional de várias pessoas, às quais desejo manifestar a minha gratidão, nomeadamente:

À minha orientadora, Professora Doutora Aida Esteves Simões, Professora Associada da Unidade de Ensino e Investigação de Microbiologia no Instituto de Higiene e Medicina Tropical, pela confiança que depositou em mim, pelo apoio e orientação na realização deste trabalho. Obrigado por me ter ajudado a encontrar soluções para os diversos obstáculos que foram aparecendo.

À minha coorientadora, Doutora Claudia Istrate, Investigadora Auxiliar Convidada da Unidade de Ensino e Investigação de Microbiologia no Instituto de Higiene e Medicina Tropical, por ter sempre uma palavra de incentivo e por todo o apoio durante esta etapa. Sinto-me muito grata por todas as recomendações e críticas que foram sempre muito construtivas e bem recebidas.

A todos os elementos do Grupo de Virologia, principalmente ao Professor Doutor João Piedade, ao Professor Doutor Ricardo Parreira e Técnica Superior Ângela Lopes Mendes pela constante disponibilidade para a resposta a qualquer pedido de ajuda.

Ao Professor Doutor Filomeno de Jesus Fortes, responsável em Angola pelo projeto, e ao Professor Virgílio E. do Rosário pelo apoio dado para iniciar e desenvolver o projeto em Angola. Aos colaboradores Dr. Pedro Rafael Dimbu e Dr. Nilton Saraiva, do Departamento do Controlo de Doenças da Direção Nacional de Saúde Pública de Angola que financiou o estudo.

Também aos profissionais de saúde Angolanos que, nos centros de saúde e hospitais locais, contribuíram para a colheita das amostras e acompanhamento dos pais e crianças, nomeadamente à Dra. Maria Cecília de Almeida e Dra. Mariana de Oliveira. Agradeço a disponibilidade da participação e consentimento dado pelos responsáveis das crianças incluídas neste estudo.

Agradeço ao Doutor Johan Nordgren, professor e investigador da Divisão de Virologia Molecular na Universidade de Linköping, Suécia, pela sua disponibilidade, auxílio laboratorial e no tratamento dos dados estatísticos.

À Cristina Mendes e Rute Marcelino, por todo o apoio e amizade nesta etapa, e por todos os cafés que tomámos juntas, para dar energia para enfrentar o dia. Nunca se esqueçam que a semana tem sempre de terminar azul.

Às minhas colegas de mestrado, em especial à Ana Bolas, Carla Ferreira, Cláudia Coroa, Débora Almeida e Mariana Fernandes, sem vocês esta caminhada não teria sido a mesma.

Aos meus amigos e *bando*, que estiveram sempre presentes, e sempre com palavras de incentivo, em especial à Inês Furtado, Márcio Cardoso, Mariana Galileu, Patrícia Nunes, Tânia Matos e Vitor Vaz.

Agradeço também à Dra. Luísa Pargana, Dra. Paula Morete Ventura e restante equipa, por perceberem a importância que tinha para mim este trabalho, e assim ajustarem esforços para que fosse possível a concretização deste ciclo de estudos. Obrigado pela vossa disponibilidade, foi a prova do lema “Mais do que palavras, *GESTUS*®”.

Por fim, gostaria de agradecer aos meus pais, pelo amor incondicional. Espero que um dia vos possa provar que este esforço valeu a pena.

*Dedico esta tese aos meus pais.*

## Resumo

---

A gastroenterite aguda (GEA) é uma das principais causas de mortalidade e morbidade em crianças com idade inferior a 5 anos, especialmente nas que vivem em países em desenvolvimento. Sabe-se que os rotavírus são a principal causa de GEA pediátrica, seguidos dos norovírus, adenovírus e astrovírus. Entre 2012 e 2013, crianças com idade inferior a 5 anos, com diarreia e que recorreram a unidades de saúde em Angola (províncias de Huambo, Zaire, Cabinda e Luanda) foram incluídas num estudo piloto com o objetivo de identificar e caracterizar agentes virais causadores de gastroenterite. A deteção e caracterização genética de adenovírus, astrovírus e norovírus foram realizadas num total de 222 amostras de fezes, negativas para rotavírus. Os astrovírus e adenovírus foram detetados por teste de ELISA e teste rápido imunocromatográfico, respetivamente, enquanto os norovírus foram detetados por PCR em tempo real com sonda TaqMan<sup>®</sup>. A genotipagem foi realizada por análise filogenética de sequências parciais do gene do hexão dos adenovírus, e da ORF2 de astrovírus e norovírus.

Nas amostras fecais, foi possível identificar norovírus, adenovírus e astrovírus, com taxas de deteção de 17% (37/222), 11% (24/222) e 5% (11/222), respetivamente. A maioria dos norovírus detetados (81%, 30/37) pertencia ao genogruppo GII, sendo os genótipos mais prevalentes GII.6 (9/30), GII.4 (8/30, incluindo duas variantes *Sydney* 2012) e GII.7 (6/30). Os genótipos GII.1, GII.2, GII.3, GII.9, GII.14 e GII.16 foram também identificados. Os norovírus GI foram classificados como GI.3 (5/7) e GI.5 (1/7). Quanto aos adenovírus, os tipos mais abundantes foram HAdV-41 (7/24), HAdV-40 (4/24) e HAdV-1 (4/24). Porém, foram igualmente identificados HAdV-2, -5, -9, -15/-29, -18, -26, -27 e -61. Os astrovírus foram genotipados como HAstV-5 (3/7), HAstV-1 (2/7) e HAstV-3 (2/7). Para nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo sobre vírus entéricos, para além dos rotavírus, realizado em crianças com GEA em Angola e revela a presença de norovírus, adenovírus e astrovírus em cerca de um terço das amostras estudadas. Ainda, os diferentes vírus apresentam uma grande diversidade de estirpes em circulação, incluindo variantes menos comuns.

Palavras-chave: gastroenterite aguda, adenovírus, astrovírus, norovírus, crianças Angola.

## Abstract

---

Acute gastroenteritis (AGE) is one of the most common childhood diseases, affecting especially the developing countries. Rotavirus is considered the leading cause of paediatric diarrhoea along with noroviruses, astroviruses, and adenoviruses.

During 2012 and 2013, children under 5 years diagnosed with AGE in health care units of Angola (Huambo, Zaire, Cabinda and Luanda provinces) were enrolled in a pilot study aiming to characterize viral gastroenteritis etiological agents. Detection and genetic characterization of noroviruses, astroviruses, and adenoviruses was performed in a total of 222 stool samples negative for rotavirus. Astroviruses and adenoviruses were screened by ELISA and immunochromatographic rapid test, respectively, while noroviruses were detected by in house TaqMan<sup>®</sup> real-time PCR. Genotyping was carried out by phylogenetic analysis of a segment of the hexon gene for adenoviruses and partial ORF2 sequences for noroviruses and astroviruses.

Noroviruses, adenoviruses, and astroviruses were identified in faecal specimens with detection rates of 17% (37/222), 11% (24/222), and 4% (9/222), respectively. The majority of the noroviruses (81%, 30/37) belong to the GII genogroup, the most prevalent genotypes being GII.6 (9/30), GII.4 (8/30, with two Sydney 2012 variants), and GII.7 (6/30). Though at lower rates, GII.1, GII.2, GII.3, GII.9, GII.14, and GII.16 strains were also recognized. GI noroviruses were genotyped as GI.3 (5/7) and GI.5 (1/7). The most prevalent adenovirus types were HAdV-41 (7/24), HAdV-40 (4/24), and HAdV-1 (4/24) but HAdV-2, -5, -9, 15/29, -18, -26, -27, and -61 were also identified. Astroviruses were acknowledged as HAstV-5 (3/7), HAstV-1 (2/7), and HAstV-3 (2/7).

To our knowledge, this is the first report on viral enteric pathogens, other than rotaviruses, infecting children with AGE in Angola and demonstrates that altogether noroviruses, adenoviruses, and astroviruses were detected in about one third of the samples studied. In addition, individual pathogens show a high diversity of circulating strains including unusual ones.

Key-words: acute gastroenteritis, adenovirus, astrovirus, norovirus, children, Angola.



## Índice Geral

---

Elementos bibliográficos Resultantes da Dissertação.....	i
Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Índice Geral.....	vi
Lista de Abreviaturas.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Adenovírus.....	4
1.1.1 Estrutura do Virião.....	5
1.1.2 Organização genómica.....	6
1.1.3 Ciclo Replicativo.....	7
1.1.4 Epidemiologia.....	10
1.2 Astrovírus.....	11
1.2.1 Estrutura do virião.....	12
1.2.2 Organização do genoma.....	12
1.2.3 Ciclo Replicativo.....	14
1.2.4 Epidemiologia.....	15
1.3 Norovírus.....	16
1.3.1 Estrutura do Virião.....	17
1.3.2 Organização genómica.....	18
1.3.3 Ciclo Replicativo.....	19
1.3.4 Epidemiologia.....	21
1.4 Objetivos.....	24
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
2.1 População estudada.....	25
2.2 Amostra.....	26
2.3 Adenovírus.....	27

2.3.1	Deteção de HAdVs por teste rápido .....	27
2.3.2	Extração de DNA viral .....	28
2.3.3	Amplificação por <i>nested</i> -PCR de um fragmento do gene codificador da proteína do hexão .....	28
2.3.4	Análise dos produtos de PCR .....	29
2.4	Astrovírus .....	30
2.4.1	Deteção de astrovírus por ELISA .....	30
2.4.2	Extração de RNA viral .....	30
2.4.3	Síntese do cDNA .....	31
2.4.4	Amplificação por PCR da ORF1b e da ORF2 .....	31
2.5	Norovírus .....	33
2.5.1	Deteção de norovírus por RT-PCR em tempo real .....	33
2.5.2	Amplificação por PCR da região NS dos norovírus .....	35
2.6	Clonagem dos Produtos de PCR no Vetor Plasmídico <i>pGEM®-T Easy</i> .....	36
2.7	Purificação e Sequenciação dos Produtos de PCR .....	37
2.8	Análise estatística .....	38
2.9	Análise de sequências nucleotídicas .....	39
3.	RESULTADOS .....	41
3.1	Caracterização Demográfica e Clínica da População Estudada .....	41
3.2	Prevalência da infecção por adenovírus, astrovírus e norovírus .....	44
3.3	Caracterização epidemiológica da infecção por adenovírus, astrovírus e norovírus .....	46
3.4	Diversidade de genótipos de adenovírus circulantes .....	48
3.5	Astrovírus: diversidade de genótipos circulantes e potenciais vírus recombinantes .....	53
3.6	Genótipos dos norovírus circulantes .....	59
3.7	Epidemiologia da infecção pelos diferentes genótipos de adenovírus, astrovírus e norovírus .....	66
4.	DISCUSSÃO e CONCLUSÕES .....	69
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	81
6.	ANEXOS .....	103
6.1	Formulário de Informação e de Consentimento Informado .....	103
6.2	Inquérito Demográfico e Clínico .....	105

6.3	Escala para Cálculo da Gravidade dos Episódios de GEA .....	106
6.4	Indicadores de Malnutrição e Relação com a Infecção por Adenovírus, Astrovírus e Norovírus .....	107
6.5	Resultados de rt- RT PCR para Norovírus .....	108
6.6	Relação das Características Demográficas, Alimentares e Clínicas com a Infecção por Adenovírus, Astrovírus e Norovírus, em Angola (2012/2013) .....	109
6.7	Resultados Preliminares Obtidos por BLAST, após Sequenciação dos Produtos Amplificados do Gene do Hexão de Adenovírus.....	111
6.8	Resultados Preliminares Obtidos por BLAST, após Sequenciação dos Produtos Amplificados do gene RdRp e da região ORF2 de astrovírus .....	113
6.9	Resultados Preliminares Obtidos por BLAST e RIVM após Sequenciação dos Produtos Amplificados da região NS da ORF2 de norovírus .....	114
6.10	Relação das Características Alimentares e Clínicas com a Infecção por Adenovírus e Norovírus .....	117



## Lista de Abreviaturas

---

A, C, G, T	bases orgânicas constituintes dos nucleótidos adenina, citosina, guanina e timina, respetivamente
AdV	adenovírus
AstV	astrovírus
BLAST	do inglês <i><u>B</u>asic <u>L</u>ocal <u>A</u>lignment <u>S</u>earch <u>T</u>ool</i>
CAR	receptor do vírus coxsackie e adenovírus, do inglês <i><u>C</u>oxsackievirus and <u>A</u>denovirus <u>R</u>eceptor</i>
CDC	do inglês <i><u>C</u>enters for <u>D</u>isease and <u>C</u>ontrol and <u>P</u>revention</i>
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar, do inglês <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CTL	linfócito T citotóxico, do inglês, <i><u>C</u>ytotoxic <u>T</u> <u>L</u>ymphocyte</i>
DBP	proteína de ligação a DNA, do inglês <i><u>D</u>NA <u>B</u>inding <u>P</u>rotein</i>
dNTPs	5'-trifosfatos de desoxirribonucleótidos, do inglês <i>deoxynucleotide triphosphates</i>
DRA	<u>D</u> oença <u>R</u> espiratória <u>A</u> guda
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>ethylenediaminoethanetetraacetic acid</i>
GEA	<u>G</u> astroenterite <u>A</u> guda
GTC	do inglês <i><u>G</u>enome <u>T</u>ype <u>C</u>lusters</i>
HAdV	adenovírus humano
HAsV	astrovírus humano
HBGA	do inglês <i><u>h</u>isto-<u>b</u>lood group <u>a</u>ntigens</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HVR	região hipervariável, do inglês <i>hypervariable region</i>
ICTV	do inglês <i><u>I</u>nternational <u>C</u>ommittee on <u>T</u>axonomy of <u>V</u>iruses</i>
IMC	<u>I</u> ndice de <u>M</u> assa <u>C</u> orporal
ITR	repetições terminais invertidas, do inglês <i><u>I</u>nverted <u>T</u>erminal <u>R</u>epeats</i>
MEGA	do inglês <i><u>M</u>olecular <u>E</u>volutionary <u>G</u>enetics <u>A</u>nalysis</i>
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade, do inglês <i><u>M</u>ajor <u>H</u>istocompatibility <u>C</u>omplex</i>

MLTU	do inglês <i>major late transcription unit</i>
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro, do inglês <i>messenger ribonucleic acid</i>
nt	nucleótidos
NCBI	do inglês <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NoV	norovírus
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	grelha de leitura aberta, do inglês <i>Open Reading Frame</i>
Pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
RdRp	RNA-polimerase dependente de RNA, do inglês <i>RNA-dependent RNA polymerase</i>
RIVM	do holandês <i>Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu</i>
RNase	ribonuclease
rt-RT PCR	transcrição reversa seguida de PCR em tempo real
RV	rotavírus
SD	desvio padrão, do inglês <i>Standard Deviation</i>
SPSS	do inglês <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TP	proteína terminal, do inglês <i>Terminal Protein</i>
UNICEF	do inglês, <i>The United Nations Children's Fund</i>
UTR	região não traduzida, do inglês <i>untranslated region</i>
VPg	proteína viral ligada ao genoma, do inglês <i>Viral Protein genome-linked</i>
WHO	do inglês <i>World Health Organization</i>

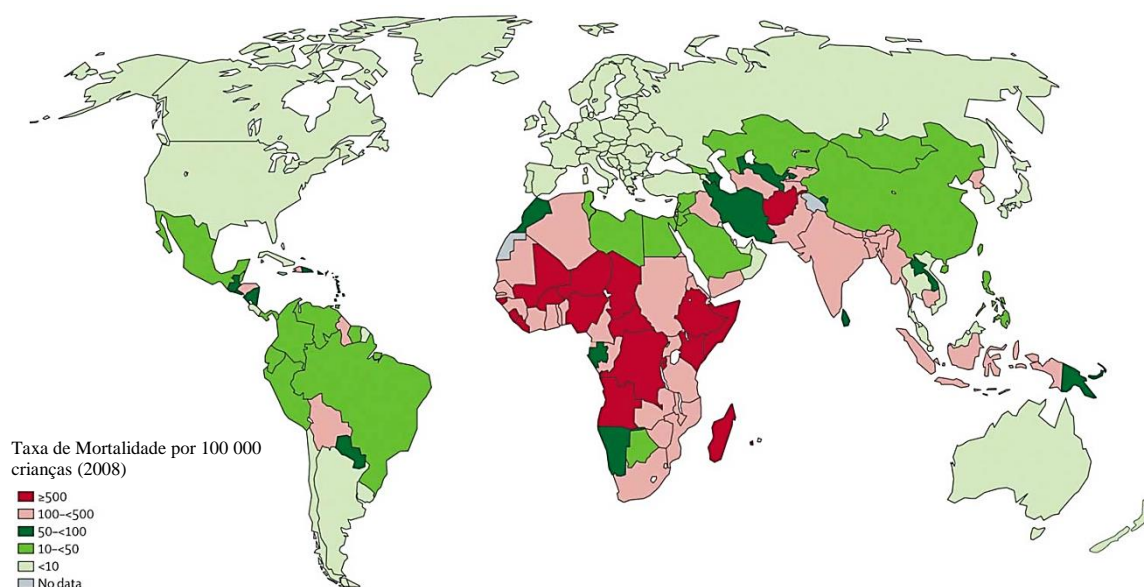
## **1. INTRODUÇÃO**

A gastroenterite aguda (GEA) é uma doença do trato gastrointestinal caracterizada essencialmente por sintomas de vômitos e diarreia. A causa mais comum é a infecção por vírus ( $\approx 75\%$ ), seguido de bactérias (10-20%) e parasitas ( $<10\%$ ) (1). A transmissão destes agentes ocorre por via fecal-oral, através da ingestão de água e alimentos contaminados, ou por contato pessoa-a-pessoa.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a diarreia é definida como três ou mais evacuações diárias de fezes líquidas ou moles (2). A diarreia pode levar à desidratação e desequilíbrio electrolítico, o que poderá ser fatal, sobretudo em crianças e indivíduos malnutridos ou imunodeprimidos (3) (4).

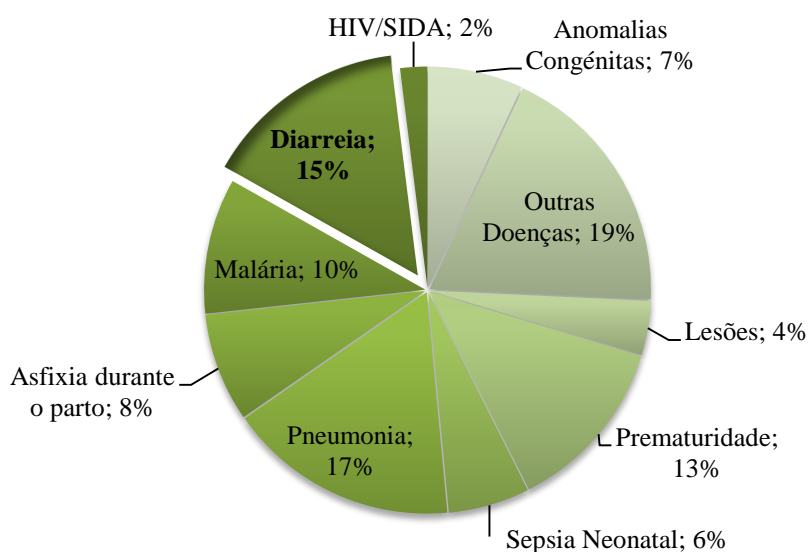
A nível global, a diarreia afeta 3 a 5 mil milhões de crianças e estima-se que seja responsável por 800000 mortes anuais em crianças com idade inferior a 5 anos (5). Aproximadamente 72% das mortes associadas à diarreia ocorre nos primeiros dois anos de vida e tende a diminuir à medida que a criança vai crescendo (6).

As infeções gastrointestinais afetam particularmente as crianças que vivem em regiões em via de desenvolvimento, como a Ásia e a África subsariana (Figura 1.1), uma vez que, nestas regiões existem fatores de risco para a diarreia infecciosa, como sejam carência de acesso a água potável, saneamento básico inadequado, fatores de risco nutricionais como a deficiência em zinco e vitamina A e o desmame precoce (7) . Dados de África, revelam que apenas 32% das crianças com idade inferior a 6 meses são exclusivamente amamentadas, e as que não o são têm 10 vezes mais probabilidade de morrerem devido a diarreia, no primeiro meio ano de vida (4) (6) (8) (9) (10).



**Figura 1.1** – Distribuição geográfica das mortes devido a diarreia em crianças com idade inferior a 5 anos (por 100000 crianças). Adaptado de Santosham, M., *et al.* (2010) (202)

Angola é o 15º país com maior taxa de mortalidade devido à diarreia, onde anualmente morrem cerca de 19700 crianças com idades inferiores a cinco anos, vítimas desta doença (6). Segundo a OMS, em Angola, a diarreia é responsável por 15% das mortes em crianças com idade inferior a 5 anos, percentagem superior a causas como a malária e VIH/SIDA (11).



**Figura 1.2** Representação gráfica da distribuição das causas de morte em Angola, em crianças com idade inferior a 5 anos (dados de 2010). Adaptado de WHO (2013) (11).



Um estudo realizado em 2007 demonstrou que mais de 75% dos episódios de diarreia têm origem viral (12). Existem mais de 20 vírus identificados como agentes etiológicos de gastroenterite em crianças (13). Porém, os rotavírus (RV) são os que apresentam maior prevalência, seguidos dos norovírus (NoV), adenovírus (AdV) e astrovírus (AstV), com taxas de detecção de 20-60%, 6-30%, 1-37% e 1-10%, respetivamente (14) (15) (16) (17) (18) (19).

Os principais sintomas descritos em crianças com GEA são diarreia, febre, dor abdominal, vômitos, fraqueza e desidratação (20) (21) (22). Na infecção por adenovírus, o período de incubação é de 3 a 10 dias. Estes vírus causam diarreias prolongadas que podem durar entre 10 e 14 dias, e com cerca de 6 a 8 episódios diários (21). Casos de mortalidade devido a GEA por adenovírus foram registados não só em indivíduos imunodeprimidos como também em crianças e adultos saudáveis (23) (24).

Tipicamente, a infecção por astrovírus tem um período de incubação de 3 a 4 dias e os sintomas podem persistir entre 2 e 7 dias. Geralmente, a infecção por astrovírus causa diarreia mais ligeira que a provocada por rotavírus ou norovírus e os vômitos também são menos prevalentes, pelo que não conduz a estados de desidratação severa, nem requer hospitalização (25). Os casos de mortalidade associados a gastroenterite por astrovírus são extremamente raros (26).

Em média, os norovírus apresentam um período de incubação muito curto (1-2 dias) e os sintomas podem persistir entre 1 e 3 dias. A seguir aos rotavírus, os norovírus são os vírus entéricos que apresentam mais casos com um índice de gravidade elevado (20). Em indivíduos imunocomprometidos, a infecção por norovírus pode ser prolongada, levando mesmo a episódios de diarreia crónica (27). Nos países em desenvolvimento, estima-se que a infecção por norovírus conduza a cerca de 200 000 mortes anuais em crianças com idades inferiores a 5 anos (27).

Segundo dados da OMS, a maioria das doenças diarreicas podem ser prevenidas através de medidas como o acesso a água potável e a uma rede de saneamento básico, melhoria nas condições de higiene pessoal e na manipulação dos alimentos, promoção da amamentação exclusiva, pelo menos nos primeiros seis meses de vida da criança, e promoção de ações de educação para a saúde nas comunidades (6) (28). Interromper a

transmissão viral é uma medida extremamente importante, principalmente no âmbito familiar, hospitalar e em creches, onde a contaminação pessoa a pessoa ocorre com frequência.

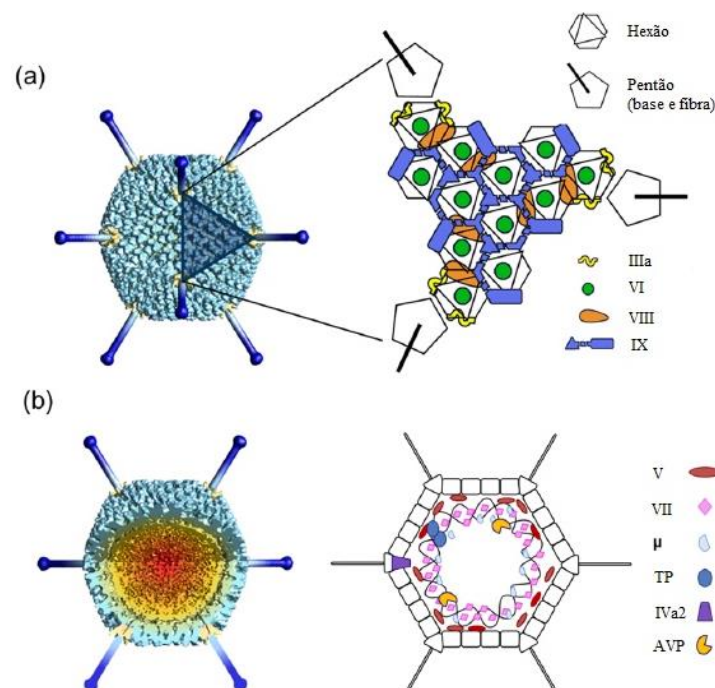
Atualmente, não existe terapia antiviral específica ou vacina licenciada para uso público contra os adenovírus, astrovírus ou norovírus. Assim, a terapia visa tratar a sintomatologia provocada pela doença gastroentérica. Nos países em desenvolvimento, a OMS e a UNICEF (*The United Nations Children's Fund*), apresentam diretrizes para o tratamento da diarreia em crianças. As organizações recomendam que as crianças tomem sais de reidratação oral de baixa osmolaridade, de modo a que haja reposição da água e dos eletrólitos perdidos nas fezes. Apesar destes sais serem considerados a terapia de referência no tratamento da diarreia em países em vias de desenvolvimento, em 2012 apenas 1/3 das crianças que vivem nestes países receberam a terapêutica (29). Juntamente com os sais, é aconselhada a toma de suplementos de zinco, de modo a reduzir a duração dos episódios de diarreia. Durante o episódio, a criança deverá ser alimentada continuamente, de preferência com leite materno ou com alimentos ricos em nutrientes (10) (28).

### 1.1 Adenovírus

Os adenovírus foram isolados e caracterizados pela primeira vez em 1953 por Wallace Rowe e colaboradores, na tentativa de identificar o agente etiológico de infecções respiratórias agudas e da cultura de tecido adenóide e de amígdalas de doentes. Os adenovírus, membros da família *Adenoviridae*, são vírus de DNA de cadeia dupla, sem envoltório, que infetam uma larga gama de hospedeiros. Os adenovírus humanos (HAdVs), incluídos no género *Mastadenovirus*, infetam para além do sistema respiratório, os sistemas urinário e gastrointestinal e a conjuntiva. De acordo com o ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*), os HAdVs são classificados em 7 espécies (A-G), cada uma delas possuindo vários tipos. Baseados inicialmente no perfil serológico e propriedades hemaglutinantes, os cerca de 70 tipos de HAdVs descritos são agora definidos com base na sequência do genoma (30).

### 1.1.1 Estrutura do Virião

Os adenovírus são vírus sem envólucro, com cápside de simetria icosaédrica e 70-100 nm de diâmetro, excluindo as fibras. Estas poderão medir entre 12 a 32nm, dependendo do tipo de adenovírus. A maioria dos HAdVs codificam para um tipo de fibra, mas os HAdV-F40, -F41 e -G52 codificam dois tipos de fibras, longas e curtas (31). A cápside é composta por 252 subunidades proteicas, das quais, 240 constituem os hexões (II), que formam as 20 faces do icosaedro, e as restantes 12 subunidades formam os pentões (III) dos vértices (Fig. 1.3). De cada pentão sai uma fibra (IV), com um domínio globular terminal, determinante do tropismo e propriedades hemaglutinantes do vírus (32). A proteína do hexão contém duas ansas (*loops*, L1 e L2). Estas ansas, projetadas na superfície do vírus, compreendem as regiões hipervariáveis 1-3 (HVR 1-3) constituindo epítopos determinantes do tipo e indutores de anticorpos neutralizantes (33) (34). No centro da partícula encontra-se o genoma viral condensado através da interação não covalente com as proteínas V, VII e  $\mu$ . Nas extremidades 5' do DNA viral está ligada a proteína terminal (Fig. 1.3).



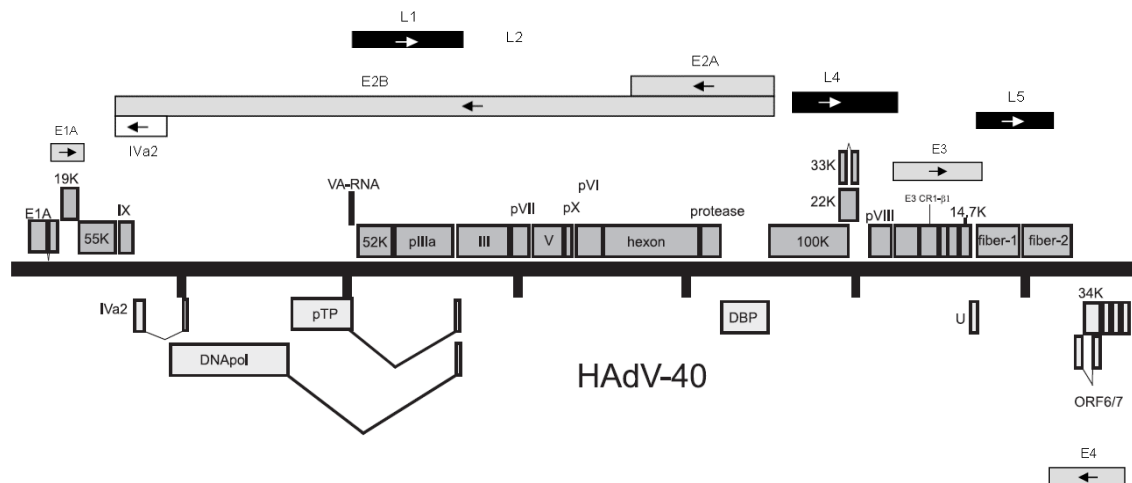
**Figura 1.3** Estrutura e composição dos adenovírus. (a) Organização da cápside viral, (b) Proteínas que se encontram no interior da cápside. Os esquemas são modelos contruídos a partir de técnicas de criomicroscopia electrónica e cristalografia de raios X. Adaptado de *Martín C.S.* (2012) (35).

### 1.1.2 Organização genómica

Os adenovírus são vírus de genoma de DNA de cadeia dupla, linear, com 26 a 45 kb de comprimento. O genoma dos adenovírus apresenta repetições terminais invertidas (ITR, de *Inverted Terminal Repeats*) com tamanhos de 36 a 200 pb, consoante o tipo de adenovírus. As ITR, localizadas nas extremidades 5' e 3', servem de origem de replicação do genoma viral e são sequências altamente conservadas entre os diferentes tipos de adenovírus (36).

Todos os adenovírus humanos apresentam uma organização genómica semelhante (Fig. 1.4). O genoma destes vírus está dividido em três regiões: precoce “E” (do inglês *early*), intermédia e tardia “L” (do inglês *late*), que correspondem às fases do ciclo replicativo em que são expressas. Na fase precoce são transcritos genes que modulam as funções celulares, facilitando assim a replicação do DNA viral e posterior transcrição dos genes tardios. Na fase tardia, os genes transcritos codificam principalmente proteínas estruturais, necessárias à montagem da partícula viral.

No genoma viral existem oito unidades de transcrição dependentes da RNA-polimerase II. Cinco unidades de transcrição precoce (E1A, E1B, E2, E3 e E4), duas unidades de transcrição intermédia (pIX e PIVa2), e uma unidade de transcrição tardia principal (MLTU) que é processada em cinco famílias de mRNAs (L1 a L5). Os adenovírus codificam também pequenos segmentos de RNA, VAI e VAII, que são transcritos pela RNA-polimerase III (37).



**Figura 1.4** - Organização do genoma do HAdV-40. O genoma é representado pela linha horizontal central marcada em intervalos de 5kpb. As caixas acima da linha representam as proteínas que são codificadas na cadeia de DNA de sentido positivo e as caixas abaixo da linha representam as proteínas que são codificadas na cadeia de DNA de sentido negativo. A direção da transcrição é indicada pelas setas nas caixas que indicam as unidades transcricionais Adaptado de Tiemesse, C.T., *et al.* (1995) e Jones II, M.S., *et al* (2007) **(36) (38)**.

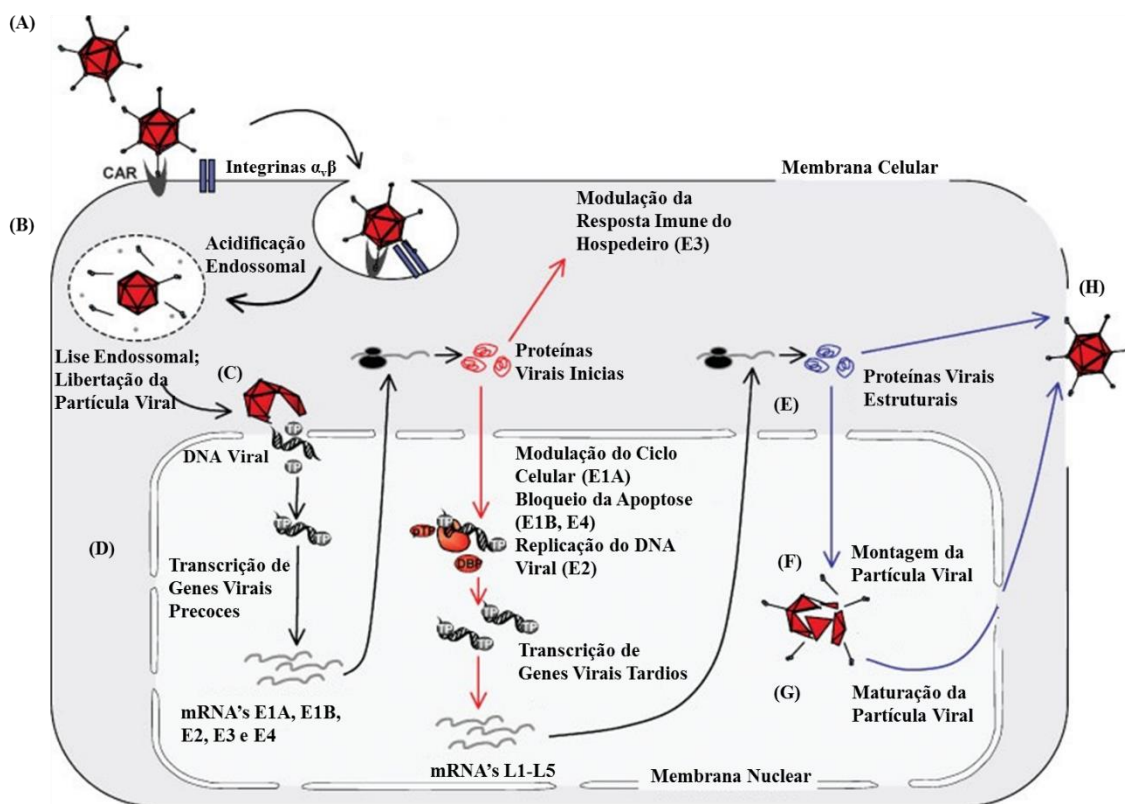
### 1.1.3 Ciclo Replicativo

O ciclo replicativo dos adenovírus apresenta uma fase inicial que compreende a entrada do vírus na célula hospedeira, a passagem do genoma viral para o núcleo, e a transcrição e tradução de genes precoces. Estes eventos iniciais promovem a replicação do DNA e consequentemente a transcrição e tradução de genes tardios, que por sua vez levam à montagem das proteínas estruturais e maturação da partícula viral (Fig. 1.5) (39).

Os adenovírus ligam-se a receptores da célula hospedeira através das suas fibras. Os receptores podem ser do tipo CAR (*Coxsackie-Adenovirus Receptor*), utilizado pela maior parte dos tipos de adenovírus (HAdV-A, -C a -F), MHC-I (Complexo Major de Histocompatibilidade Classe I), CD46 (HAdV-B), CD80 e CD86, Integrinas  $\alpha_M\beta_2$  e  $\alpha_L\beta_2$ , e ácido siálico (40) (39). Para além dos receptores, a célula também tem coreceptores, as integrinas  $\alpha_v\beta$  ( $\alpha_v\beta_3$  e  $\alpha_v\beta_5$ ), que interagem com a base do pentão. Estas

interações conduzem à internalização da partícula viral por mecanismos de endocitose mediada por clatrina [Fig. 1.5 (A)] (37).

A partícula viral é transferida para um compartimento endossomal intracelular, onde o vírus sofre alterações conformacionais devido ao pH baixo. O pH ácido conduz também à ativação da proteína VI, que promove a permeabilização da membrana do endossoma, e consequente libertação da subpartícula viral para o citoplasma [Fig. 1.5 (B)]. As subpartículas virais são transportadas pelos microtúbulos, por intermédio de proteínas motoras como a dineína e a dinactina até à membrana nuclear (37) (39).



**Figura 1.5** - Ciclo replicativo dos adenovírus. Adaptado de Lenaerts, L., *et al.* (2008) (41)

A subpartícula viral liga-se às proteínas CAN/Nup214 do complexo do poro nuclear (NPC). Esta ligação recruta histonas nucleares que, por sua vez, recrutam importinas e fatores citoplasmáticos, o que resulta na desmontagem final da cápside e posterior entrada do genoma viral no núcleo [Fig. 1.5 (C)].

No núcleo, inicia-se a transcrição dos genes precoces. O gene E1A é o primeiro a ser expresso, e tem como função modelar o metabolismo da célula hospedeira, tornando-a mais suscetível à replicação do vírus. O gene E1B codifica proteínas que bloqueiam a apoptose, estimulada pelas funções de E1A. A unidade transcricional E2 codifica as proteínas necessárias à replicação, como a DNA-polimerase viral, a proteína de ligação a DNA (DBP, *DNA binding protein*) e a proteína terminal (TP, *terminal protein*). Proteínas codificadas pelos genes E3 contribuem para a inibição da apoptose e impedem que as células T citotóxicas (CTL) reconheçam células infectadas pelo vírus. Os genes E4, para além de estarem envolvidos no bloqueio da apoptose, facilitam a tradução do mRNA viral tardio [Fig. 1.5 (D)] (37) (39) (42).

Como o genoma dos adenovírus apresenta ITRs, cada uma das cadeias possui uma origem de replicação. Na replicação do DNA viral, os adenovírus utilizam como *primer* para iniciar o processo a pTP (precursor da proteína terminal), que se encontra covalentemente ligada à extremidade 5' em ambas as cadeias. Com o auxílio dos fatores de replicação celulares Nf-1 e Oct-1, a DNA-polimerase viral, liga-se à pTP na origem de replicação e inicia o processo de síntese de uma nova cadeia no sentido 5'-3'. À medida que a cadeia matriz é lida, a cadeia complementar é deslocada da dupla hélice e revestida por DBP. Quando a primeira cadeia acaba de ser sintetizada, a cadeia parental complementar deslocada forma uma estrutura circular, através do emparelhamento das extremidades, originando dsDNA com uma origem de replicação e permitindo que a DNA-polimerase viral inicie a síntese de uma nova cadeia.

Imediatamente a seguir à síntese do DNA viral, os genes tardios começam a ser transcritos, essencialmente para tradução de proteínas estruturais. Apesar destas serem sintetizadas no citossol, a montagem da partícula viral ocorre no núcleo [Fig. 1.5 (E)]. Primeiro é formada uma partícula vazia com hexões, pentões e fibras [Fig. 1.5 (F)]. Uma proteína codificada pelo mRNA L4 ajuda na agregação dos hexões. De seguida, proteínas codificadas por L1 auxiliam a encapsidação do DNA viral. Numa fase final da montagem, ocorrem cortes proteolíticos que originam proteínas da cápside como a IIIa, TP, VI, VII, e  $\mu$  [Fig. 1.5 (G)]. A partícula viral torna-se assim estável e infecciosa. A membrana nuclear da célula hospedeira torna-se permeável, o que facilita a saída do

vírus para o citoplasma. Por sua vez, há uma desintegração da membrana plasmática, o que permite a libertação do vírus da célula [Fig. 1.5 (H)].

### **1.1.4 Epidemiologia**

Os HAdVs têm sido associados a uma grande variedade de doenças e, apesar de não existir uma relação estrita entre o tipo de HAdV e a doença provocada, é possível fazer generalizações. Cerca de 7% das infeções das vias respiratórias em crianças têm como agente etiológico HAdV-C1, -C2, -C5 e -C6 e, ocasionalmente, -B3 e -B7. Para além destes últimos, também os tipos HAdV-B16, -B21, -B50 e -E4 estão associados a Doença Respiratória Aguda (DRA) em adultos, especialmente em recrutas militares (42). HAdV-B11 e -B21 têm estado relacionados com cistite hemorrágica aguda, enquanto os vírus da espécie D, e em particular os tipos HAdV-D8, -D19, -D37, -D54 foram identificados em casos esporádicos e surtos de queratoconjuntivite epidémica grave. (38).

Os tipos HAdV-F40 e -F41 são os mais frequentemente associados a casos de gastroenterite aguda, e por isso denominados “adenovírus entéricos”. Estes dois tipos são responsáveis por 1 a 22% dos episódios de diarreia em crianças (43) (44) (45) (46) (47). No entanto, os adenovírus causadores de infeções respiratórias podem apresentar excreção fecal prolongada, mesmo quando já não são detetados nas mucosas respiratórias (48), dificultando a sua associação a doença entérica quando detetados em amostras fecais de indivíduos com diarreia. Assim, além dos adenovírus entéricos, outros adenovírus como os HAdV-A12, -A18, -A31, -B3, -B7 -C1, -C2, -C5, -D8, -D9, -D10 -D15, -D17 foram identificados em casos de diarreia em crianças (17) (19) (21) (43) (44) (46). Ainda, em consequência da epidemia de SIDA, foram identificados em indivíduos imunocomprometidos com pneumonia e/ou diarreia uma série de novos adenovírus da espécie D, designadamente HAdV-D20, -D22, -D26, -D28a -D30, -D32, -D37, -D43 a -D49, -D60 e -D62 (49) (50) (51). Num estudo publicado em 2007, num doente com gastroenterite foi identificado um novo tipo, HAdV-52, e criada uma nova espécie, HAdV-G (38). Nos dois últimos anos, foram identificados em fezes de crianças



com GEA adenovírus dos tipos HAdV-D65 e -D67 (52) (53). Curiosamente, e provavelmente devido à coinfeção com diferentes tipos poder ser comum a nível da mucosa intestinal, a sequenciação e análise filogenética de alguns destes vírus revelou serem vírus recombinantes envolvendo dois ou mais tipos já conhecidos (51) (52) (53).

A infeção por HAdVs ocorre globalmente, e com uma taxa de deteção semelhante entre o sexo masculino e feminino (54). A maioria dos adenovírus afeta crianças com idade inferior a 2 anos (20) (43) (44) (55) (56). Estudos longitudinais demonstraram que estes vírus não apresentam variações de deteção ao longo do ano (46) (54) (55) (57). Porém, alguns estudos detetam ligeiros picos no inverno e na primavera (12) (43) (44) (45).

## 1.2 Astrovírus

Os astrovírus foram descritos em 1975, primeiro por Appleton e Higgins e mais tarde por Madeley e Cosgrove, quando da observação, por microscopia eletrónica, de partículas virais em forma de estrela em amostras de fezes de crianças com GEA (58) (59).

Em 1995, o ICTV criou a família *Astroviridae* para incluir vírus com genoma de RNA de cadeia simples e polaridade positiva, com simetria icosaédrica (28-41 nm de diâmetro), sem invólucro e com forma de estrela de cinco ou seis pontas. Esta família inclui dois géneros, *Avastrovirus*, de que fazem os astrovírus que infetam espécies aviárias e *Mamastrovirus*, que inclui os astrovírus que infetam uma larga variedade de mamíferos. Segundo o ICTV, cada um dos géneros inclui várias espécies baseadas na partilha de >75% de identidade da sequência de aminoácidos da proteína da cápside (ORF2), a região mais variável do genoma.

O género *Mamastrovirus*, com pelo menos 19 espécies, inclui uma espécie protótipo dos astrovírus humanos (HAstV ou mamastrovírus 1), altamente diversa, constituída por oito genótipos (HAstV-1 a -8), correspondentes aos oito serotipos

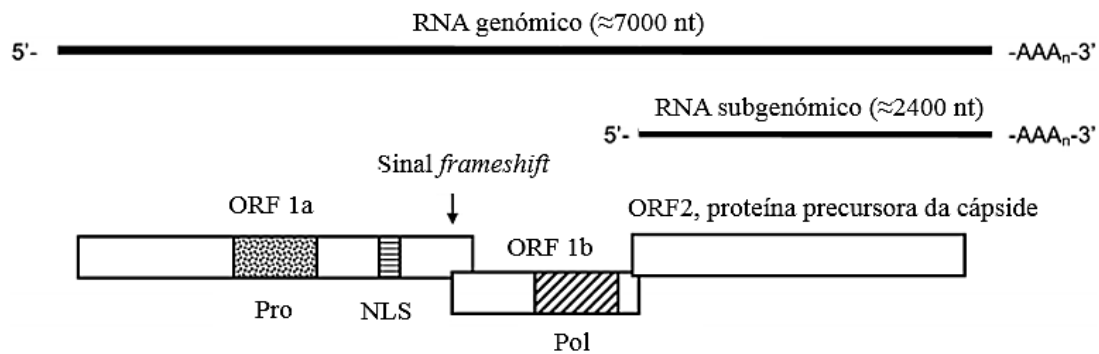
previamente identificados, conhecidos como HAstVs clássicos por oposição a astrovírus muito divergentes, recentemente encontrados em amostras de fezes de doentes com diarreia. Estes novos astrovírus constituem dois grupos filogenéticos bem distintos. O primeiro foi designado MLB por ter sido inicialmente identificado em amostras fecais pediátricas de Melbourne, Austrália (60). AstV-MLB foi subsequentemente detetado noutras partes do mundo e designado mamastrovírus 6 (61). O segundo grupo filogenético é conhecido como HAstV-VA, por inicialmente ter sido detetado na Virgínia (62), e também como HAtV-HMO (astrovírus Humano, Marta e Ovino), devido a estar filogeneticamente perto dos astrovírus de marta e de ovinos e inclui duas espécies, mamastrovírus 8 e 9 (63). Recentemente, foi descrito um novo astrovírus divergente relativamente às espécies descritas, HAstV-BF34, identificado no Burkina Faso e tentativamente classificado como mamastrovírus 20 (64).

### 1.2.1 Estrutura do virião

Estudos recentes de criomicroscopia electrónica revelaram uma cápside icosaédrica de 35 nm, composta por 180 subunidades proteicas e decorada com 30 ou 90 espículas diméricas globulares nas partículas maduras e imaturas, respetivamente, resultando numa partícula de 44 nm (65).

### 1.2.2 Organização do genoma

Os astrovírus apresentam um genoma de RNA de cadeia simples, polaridade positiva (ssRNA(+)), *single strand* RNA) de aproximadamente 7 kb. Possui a proteína viral VPg (*Viral Protein genome-linked*) ligada covalentemente ao extremo 5' e uma cauda poliadenilada 3' (Fig. 1.6). Nas extremidades 5' e 3' existem regiões não traduzidas (UTRs, *Untranslated Regions*) conservadas entre os diferentes tipos de astrovírus.



**Figura 1.6** - Organização genômica do HAstV-1. Localização das três ORFs, da protease serínica (PRO), do sinal de localização nuclear (NLS), do sinal de *frameshift*, da RdRp (Pol) e do RNA subgenômico. Adaptado de Krishna, N.K., *et al.* (2011) (66).

No genoma dos astrovírus identificam-se três grelhas de leitura aberta (ORF, *Open Reading Frame*), ORF1a, ORF1b e ORF2 (Fig. 1.6). Nos astrovírus, a ORF1a e a ORF1b codificam proteínas não estruturais (nsPs), incluindo uma protease serínica (nsp1a) e a RdRp (nsp1b), respetivamente. A ORF1a e a ORF1b apresentam uma região de sobreposição, de 10 a 148 nucleótidos, conservada entre os diferentes tipos de astrovírus (26). Nesta região existe um sinal de *frameshift* necessário para a tradução da RdRp viral. O tamanho das ORFs pode variar consoante a espécie e o tipo de astrovírus, sendo a ORF1a a sequência que pode ter maior variação devido à região de inserção/deleção na extremidade 3' da ORF (67).

A ORF2, localizada na extremidade 3', é expressa a partir de um RNA subgenômico e codifica as proteínas da cápside viral (26). Entre a ORF1b e a ORF2, no género *Mamastrovirus* (exceto no HAstV-8) há uma sobreposição de oito nucleótidos entre o codão STOP da ORF1b e o codão de iniciação da ORF2. A junção ORF1b e ORF2 é uma região conservada entre os diferentes tipos de astrovírus (68). A ORF2 codifica dois domínios proteicos distintos, o domínio conservado N-terminal, que vai formar o centro da cápside viral, e o domínio hipervariável C-terminal que dá origem às espículas virais. O produto primário da ORF2 é a poliproteína VP90, que é processada por caspases no domínio C-terminal, dando origem a VP70 presente nas partículas virais imaturas. Após saída da célula, VP70 é processada por tripsina dando origem a partículas virais infecciosas com VP34 mais interna, e VP27 e VP25 na superfície (26).

### **1.2.3 Ciclo Replicativo**

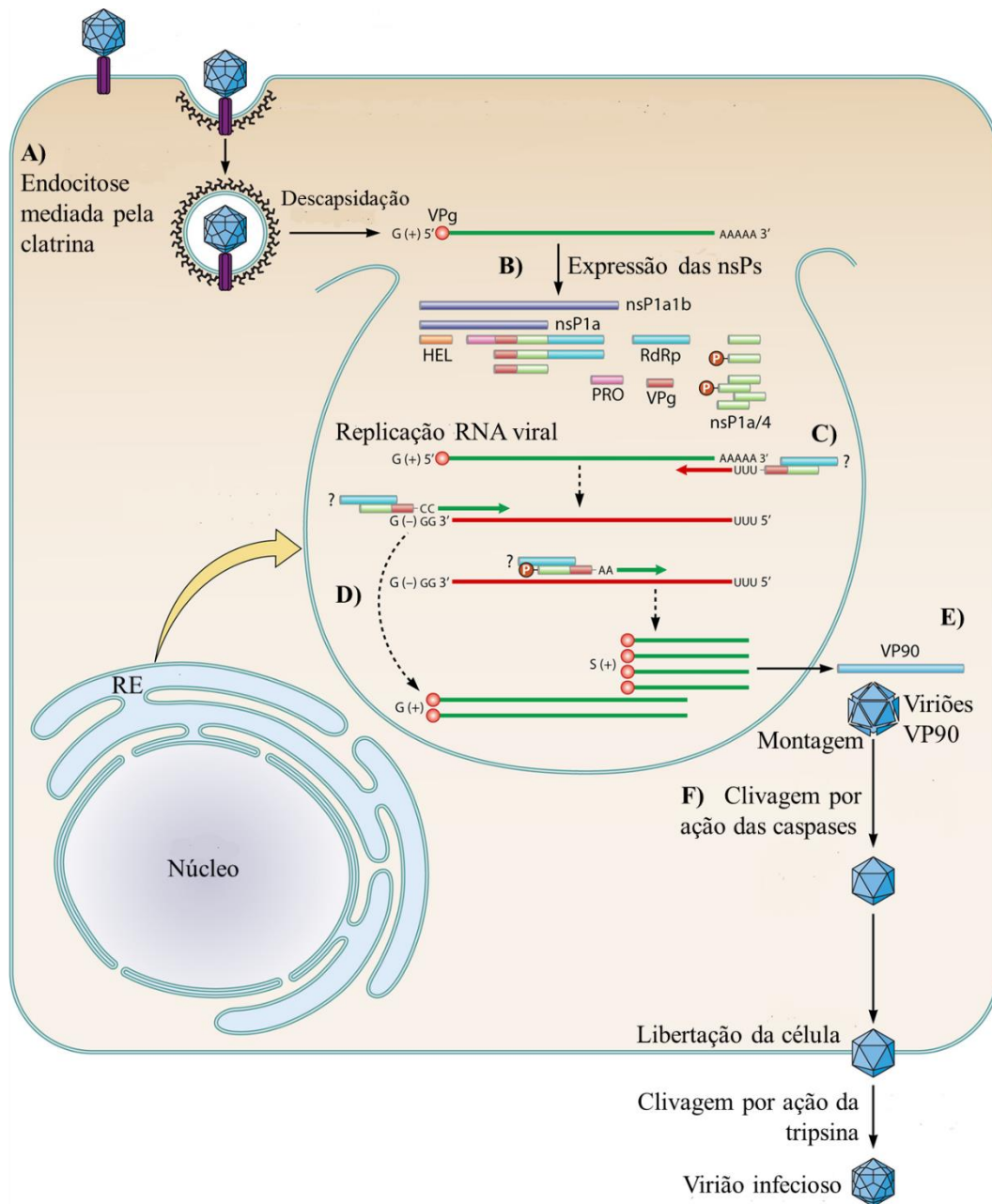
A partícula viral, após ligação a recetores celulares não identificados, entra na célula hospedeira, provavelmente, por intermédio de mecanismos de endocitose mediada por clatrina [Figura 1.7 (A)]. No interior da célula, o pH baixo conduz à descapsidação da partícula viral e o RNA genómico (gRNA) é libertado para o citoplasma, onde a ORF1a e ORF1b são imediatamente traduzidas pela célula hospedeira [Figura 1.7 (B)].

A VPg, no extremo 5' do genoma viral (G(+)), interage com fatores de iniciação da tradução, promovendo assim a tradução da ORF1a e ORF1b em duas poliproteínas não estruturais, nspl1a e nspl1b que, posteriormente, são cortadas por proteases virais e celulares, originando assim proteínas não estruturais, como a RdRp, essenciais para a replicação do genoma [Figura 1.7 (C)].

Forma-se então um complexo de replicação viral, do qual faz parte a RdRp, que utiliza como molde G(+) viral para produzir uma cadeia de RNA de polaridade negativa (G(-)) que, por sua vez, serve de molde para formar novas cadeias de G(+) e RNA subgenómico (S(+)). A síntese de S(+) requer que a transcriptase viral reconheça um promotor, localizado na cadeia de RNA de polaridade negativa [Figura 1.7 (D)] (26).

Em estruturas membranares de dupla membrana, na vizinhança do núcleo, foi possível identificar proteínas virais estruturais (VP90), não estruturais (nspl1a, RdRp, proteases), e RNA viral, o que sugere que a replicação do genoma viral e uma primeira fase da morfogénese viral estejam associadas a membranas intracelulares, à semelhança do que acontece com outros vírus de RNA(+) (69).

Durante a morfogénese viral, VP90, por ação das caspases celulares, é cortada produzindo VP70 [Figura 1.7 (F)]. Esta clivagem está associada à saída da partícula viral da célula hospedeira. Já no exterior da célula, ocorre a maturação da cápside viral, uma vez que a VP70, por ação da tripsina, é cortada em três produtos (VP34, VP27 e VP25), e a partícula viral torna-se infecciosa. Desconhece-se o mecanismo de saída da célula.



**Figura 1.7** Ciclo replicativo dos astrovírus. Adaptado de Bosch A., *et al.*, (2014) (70).

### 1.2.4 Epidemiologia

A infecção por astrovírus ocorre a nível global e afeta sobretudo crianças com idades inferiores a 3 anos (71) (72) (73) (74) (75). No entanto, os idosos e indivíduos imunocomprometidos constituem igualmente grupos de risco (76). Estes vírus infetam

de igual modo ambos os sexos (75). Em regiões de clima temperado os HAstVs têm maior incidência nos meses mais frios, e em regiões de clima tropical, na época das chuvas (74) (77).

A prevalência dos HAstV varia entre 1% e 10% (15) (16), contudo prevalências inferiores a 1% já foram descritas (56), assim como superiores a 40% (78).

De um modo geral, estudos epidemiológicos realizados em diversos países identificaram, entre os HAstV clássicos, HAstV-1 como o genótipo mais prevalente (16) (20) (73) (79) (80) (81). Porém existem exceções em termos temporais e geográficos. Num estudo realizado em Madagascar, HAstV-3 e -8 foram descritos como os genótipos mais abundantes (82), enquanto outro conduzido no México mostrou predominância de HAstV-2 (83). Por outro lado, HAstVs recombinantes com genótipos discordantes para diferentes regiões do genoma foram identificados na Rússia, no Quênia, nos EUA e na Índia (84) (83) (85) (86) (87). Relativamente aos astrovírus humanos não canónicos, os dados existentes sugerem igualmente uma distribuição global na população humana (63) (88) (89) (90) (91). No entanto, a informação epidemiológica sobre estes vírus ainda é limitada e muito dispersa, sendo necessário atualizar as ferramentas de diagnóstico para avaliar o seu papel na saúde humana. De facto, um estudo realizado na Índia sugere não haver associação entre HAstV-MLB1 e diarreia (92). Ainda, a análise filogenética de genomas completos destes novos astrovírus e de astrovírus de animais permitiu estabelecer relações filogenéticas que suportam potencial transmissão zoonótica (93).

### **1.3 Norovírus**

Os norovírus foram visualizados pela primeira vez por imunomicroscopia electrónica, em 1972, na sequência de um surto de gastroenterite aguda em Norwalk e identificados então como o agente etiológico da “doença do vômito de inverno”, descrita cerca de cinquenta anos antes (94) (95). Inicialmente designados por vírus de

Norwalk, o protótipo do género *Norovirus* (*Norwalk-like viruses*), estão incluídos na família *Caliciviridae* conjuntamente com os vírus do género *Sapovirus*, também agentes de GEA (27).

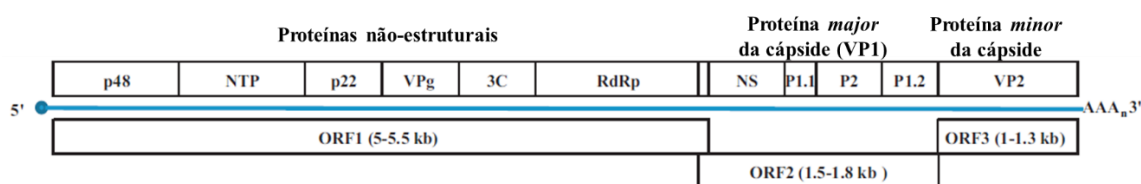
O género *Norovirus* apresenta uma grande diversidade genética, podendo ser dividido em seis genogrupos (GI a GVI) com base na divergência nucleotídica do gene da polimerase viral (ORF1) (96). Por sua vez, os genogrupos GI, GII, GIII GIV e GVI são subdivididos em 9 (GI.1 a GI.9), 22 (GII.1 a GII.22), 3 (GIII.1 a GIII.3), 2 (GIV.1 e GIV.2), 1 (GV.1) e 2 (GVI.1 e GVI.2) genótipos, respetivamente. Até agora, os genótipos dos norovírus têm sido definidos com base na divergência genética da principal proteína da cápside, VP1 (ORF2) ou, menos frequentemente, da polimerase viral (ORF1) (97). Contudo, o facto dos norovírus recombinarem ocasionalmente na junção ORF1/ORF2 indica a necessidade de se determinar o genótipo de ambas as regiões para uma genotipagem mais precisa e para a identificação de recombinantes (98). Apenas alguns genótipos dos genogrupos GI, GII e GIV afetam o Homem. Porém os norovírus têm sido isolados a partir de uma grande diversidade de outras espécies incluindo suínos (GII), bovinos e ovinos (GIII), murganhos (GV) e canídeos (GVI) (27).

### 1.3.1 Estrutura do Virião

Os norovírus são vírus sem invólucro, com simetria icosaédrica e um diâmetro de 27 a 40 nm. A cápside é constituída por 90 dímeros da proteína viral VP1 e encerra no seu interior algumas moléculas da proteína VP2 e o genoma viral, uma molécula de RNA de cadeia simples, polaridade positiva, de aproximadamente 7,5 kb. Cada proteína VP1 está dividida em braço N-terminal (N), *shell* (S) e domínio protuberante C-terminal (P), subdividido em P1 e P2 (99). O domínio S forma uma camada proteica interna à volta do genoma viral, enquanto o domínio P exposto à superfície da cápside é responsável pela ligação a recetores celulares e apresenta os principais determinantes antigénicos. Por vezes, os domínios N e S surgem com a designação conjunta NS. VP1 por si só, na ausência de genoma viral, forma VLPs (*virus-like particles*).

### 1.3.2 Organização genómica

O RNA genómico viral está covalentemente ligado a uma proteína viral, VPg, na extremidade 5' e possui uma cauda poliadenilada em 3'. Em ambos os extremos do genoma existem UTRs, com estruturas secundárias, evolutivamente conservadas (100).



**Figura 1.8** - Organização genómica dos norovírus. Representação esquemática da ORF1, -2, e -3, e proteínas correspondentes. Adaptado de Hoa Tran, T.N., *et al.* (2013) (101)

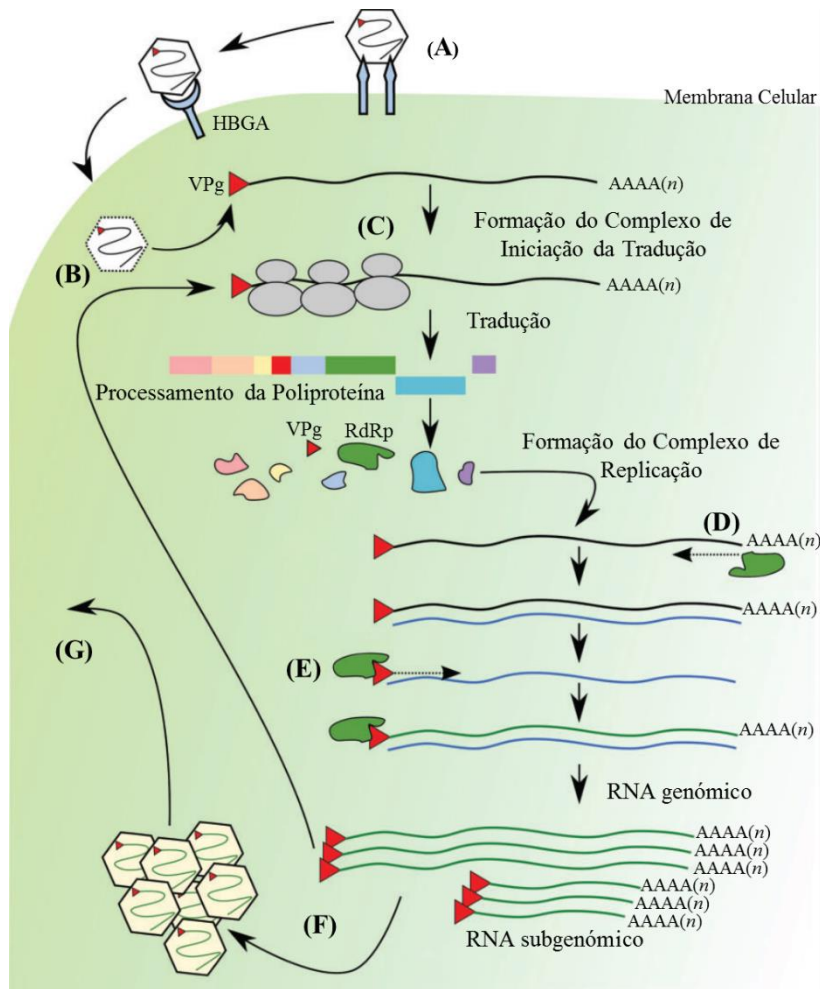
O genoma da maioria dos norovírus está organizado em 3 ORFs (ORF1, 2 e 3) (Fig. 1.8). A ORF1 ocupa os dois terços 5' do genoma e codifica uma poliproteína que vai originar seis proteínas não estruturais (p48, NTPase, p22, VPg, proteinase 3C e RdRp) necessárias à replicação viral, sendo traduzida diretamente a partir do RNA genómico viral. A ORF2 e a ORF3, codificadoras das proteínas estruturais, são traduzidas a partir de um RNA subgenómico de 2,4 kb (78). A ORF2 codifica a principal proteína da cápside viral, VP1, com os domínios NS e P. Na junção entre a ORF1 e a ORF2 ( $\approx 17$  nucleótidos) é possível encontrar forte similaridade de sequências dentro dos genogrupos individuais, e como tal é a região de eleição a ser analisada quando se pretende determinar os genogrupos (101). A terceira ORF codifica uma proteína da cápside pouco abundante, VP2, que promove a encapsidação do RNA genómico e a estabilidade de VP1 (27) (101). A ORF2 é traduzida através de um mecanismo de terminação/reiniciação (102).



### 1.3.3 Ciclo Replicativo

Os norovírus humanos (NoVs) não se replicam em culturas celulares e, até à data apenas os norovírus murinos podem ser multiplicados em cultura. Assim muito dos dados do ciclo replicativo resultam da utilização de norovírus murino ou de VLPs de NoVs. A adsorção dos norovírus à célula hospedeira envolve a ligação do subdomínio P2 da proteína VP1 a açúcares da superfície celular que, no caso dos NoVs, são antigénios do grupo de histocompatibilidade-sanguíneo (HBGA, *histo blood group antigens*). Este facto explica a correlação demonstrada entre suscetibilidade à infeção e o estatuto secretor, correspondente a um gene FUT2 funcional necessário para a expressão de HBGA (103). Após ligação a HBGA [Figura 1.9 (A)] (101), o vírus entra na célula por um mecanismo ainda não elucidado, sofre descapsidação e consequente libertação do RNA genómico viral no citoplasma [Figura 1.9 (B)]. VPg, ligada à extremidade 5' do genoma, recruta fatores de iniciação da tradução da célula hospedeira que interagem com as estruturas secundárias do RNA para formar um complexo de iniciação da tradução [Figura 1.9 (C)] (104). A ORF1 é traduzida numa poliproteína que, por sua vez, é cortada pela proteinase 3C viral em seis proteínas não estruturais que irão participar na replicação do RNA viral (27).

A replicação do RNA viral decorre em associação com complexos membranares perinucleares induzidos por p48 e p22 (105). A cadeia de RNA de polaridade positiva serve como molde à síntese de um RNA intermediário de polaridade negativa. A replicação tem início na extremidade 3' da cadeia matriz, e para tal a RdRp utiliza um mecanismo de iniciação *de novo* [Figura 1.9 (D)]. Por sua vez, a cadeia de RNA de polaridade negativa formada, serve de molde à transcrição do RNA genómico, de polaridade positiva, e subgenómico. Nesta fase a RdRp utiliza um mecanismo de iniciação dependente de VPg, funcionando esta como *primer* para a síntese das novas cadeias [Figura 1.9 (E)] (27) (101).



**Figura 1.9** - Ciclo replicativo dos norovírus. Adaptado de Thorne , L. G., *et al.* (2014) (106)

Após a síntese do RNA subgenômico, ocorre a tradução das proteínas VP1 e VP2, necessárias à montagem do vírião [Figura 1.9 (F)]. Os mecanismos de montagem da cápside, encapsidação do genoma e saída dos virões são largamente desconhecidos. Como outros vírus da família *Caliciviridae*, pensa-se que os norovírus induzem a apoptose da célula, levando assim a alterações da membrana celular e à saída dos viriões [Figura 1.9(G)] (101).

### 1.3.4 Epidemiologia

A nível global, os norovírus são considerados uma das principais causas de gastroenterite afetando indivíduos de todas as idades, tanto em países industrializados como em países em vias de desenvolvimento. De um modo geral, pode-se distinguir quatro categorias epidemiológicas para os norovírus: i) surtos de gastroenterite provocados por alimentos ou água contaminados, ii) infecção de imunocomprometidos e idosos, iii) casos esporádicos de gastroenterite em crianças com menos de 5 anos de idade e iv) casos esporádicos de GEA em adultos (101). A seguir aos rotavírus, os norovírus são a segunda causa de gastroenterite viral em crianças com idade inferior a 5 anos. Estima-se que nesta faixa etária, estes vírus tenham sido responsáveis por 12%-17% das hospitalizações por diarreia entre 1990 e 2014 e 200 000 mortes anuais nos países em vias de desenvolvimento. (27) (107) (108) (109).

Os norovírus afetam indivíduos de todas as idades, tendo uma maior prevalência em crianças com idades inferior a 2 anos (18) (110) (111). Os norovírus atingem de igual modo indivíduos do sexo feminino e masculino (18) (112), no entanto existem estudos que descrevem maior prevalência num dos sexos (113) (114).

É possível identificar casos de gastroenterite por infecção com NoVs durante todo o ano. Contudo, é possível generalizar padrões de sazonalidade entre os países de clima temperado e os de clima tropical. Nos países de clima temperado, a gastroenterite por NoVs é mais comum no outono, inverno e início da primavera, sendo como tal conhecida por *winter vomiting disease* (115) (116) (117). Nos países de clima tropical, os surtos são mais frequentes durante a estação mais fria e seca (18) (111) (113).

Através de estudos de meta-análise, Ahmed e colaboradores concluíram que os NoVs são responsáveis por 18% dos casos de gastroenterite aguda em todo o mundo. O grupo também verificou que os casos de GEA por NoVs são mais comuns na comunidade e em doentes em ambulatório, do que em doentes hospitalizados (108).

Estudos de epidemiologia molecular relatam frequentemente a co-circulação de vários genótipos de norovírus dos genogrupos GI e GII, sendo este último responsável por 70-100% dos casos esporádicos (18) (107) (110). Existe uma associação

significativa entre estes dois genogrupos e o modo de transmissão. Os surtos com origem em GI, comparativamente com GII, estão mais relacionados com transmissão por via de água contaminada, o que pode refletir a maior estabilidade de GI na água (118) (119). Por sua vez, os norovírus GII, em comparação com os GI, estão mais associados a surtos em locais públicos semifechados, como lares, centros de dia, restaurantes, e navios de cruzeiro, onde predomina a transmissão por alimentos contaminados e pessoa-a-pessoa (27) (120) (121) (122).

Globalmente, os norovírus GII.4 são responsáveis por cerca de 55-85% dos casos de GEA por estes vírus (27) (123). Este é o genótipo mais virulento, uma vez que, para além da elevada prevalência, os indivíduos infetados com norovírus GII.4 apresentam uma maior taxa de hospitalização e de mortes, comparativamente com indivíduos infetados com norovírus de outros genótipos (27) (124). Na última década, depois de GII.4, GII.3 surge como o segundo mais prevalente globalmente, embora nalguns países esta posição seja ocupada por GII.6. Os genótipos GI.1, GI.3, GI.4, GI.6, GII.1, GII.2 e GII.7, são frequentemente identificados, mas com prevalências inferiores (14) (18) (27) (56) (101) (111) (123) (125).

O aumento global da prevalência de norovírus como agente etiológico de GEA tem sido causado pelo aparecimento de novas variantes de GII.4 à semelhança do que acontece com o vírus da gripe. Desde o início dos anos 90, novas variantes têm surgido a cada 2-3 anos. Desde 1995, as variantes de GII.4 já levaram a pelo menos sete epidemias globais de gastroenterite. A estirpe GII.4 US95/96 foi primeiro identificada em Inglaterra e depois nos EUA, onde foi responsável por cerca de 55% dos surtos de norovírus. Entre 1995-1997, a estirpe apresentou uma circulação global, tendo sido identificada no Canadá, Austrália, Holanda, China e Alemanha (125) (126).

Entre 2000 e 2004, a estirpe US95/96 foi substituída por uma nova variante, a GII.4 *Farmington Hills*, responsável por cerca de 45% dos surtos de norovírus que ocorreram nos EUA em 2002. A prevalência subiu para 64% em surtos que ocorreram em cruzeiros (127). Esta variante foi também detetada na Austrália (125). Simultaneamente, na Ásia, e principalmente na Europa, emergiu outra variante, GII.4b (128) (129) (130).

Em 2004, surgiu uma nova epidemia global, originada pela variante GII.4 *Hunter*. Esta variante foi detetada na Austrália, Ásia, Europa e África do Norte (125) (130) (131) (132) (133).

Dois anos mais tarde, a variante *Hunter* foi substituída por duas variantes que co-circulavam na Ásia, América do Norte e Sul, Europa e Austrália, as variantes 2006a (GII.4 *Laurens*) e 2006b (GII.4 *Minerva*) (14) (132) (134) (135) (136).

Em 2009, emergiu uma nova variante, a GII.4 *New Orleans*, que entre 2009-2010 foi responsável por 60% dos surtos que ocorreram nos EUA (137). Esta variante foi também identificada noutros países, como Inglaterra, Itália, Austrália, África do Sul, Burkina Faso, Rússia (138) (139) (140). Contudo, entre 2005 e 2010, a variante 2006b foi considerada predominante, representando cerca de 90% das variantes GII.4 isoladas em todo o mundo (101).

Em 2012, novos surtos de norovírus começaram a emergir em diversos países, devido a uma nova variante, GII.4 *Sydney*. Esta variante recombinante foi identificada na cidade australiana, onde nesse mesmo ano foi responsável por cerca de 30% dos surtos de GEA. Entre 2012-2013, a variante *Sydney* foi responsável por mais de 55% dos surtos que ocorreram em Inglaterra e nos EUA, em apenas 4 meses foram reportados mais de uma centena de surtos por norovírus GII.4 *Sydney* (138) (141). A variante também foi identificada em países como Itália, China, Bangladesh, Brasil, África do Sul, Marrocos, entre outros (139) (142) (143) (144) (145) (146). Atualmente a variante GII.4 *Sydney* é predominante, e segundo uma rede *online* de laboratórios de saúde pública nos EUA, a CaliciNet, entre Setembro 2013 e Agosto 2014, a variante foi responsável por 56% dos surtos de norovírus que ocorreram nos EUA (147).

## **1.4 Objetivos**

Dados de 2010 revelam que a diarreia foi responsável por 15% das mortes em crianças com idade inferior a 5 anos, em Angola (11). Desta percentagem sabe-se que 33% correspondem a mortes relacionadas com a infeção por rotavírus, e os restantes 67% a mortes devido a diarreia provocada por outros agentes etiológicos (148).

Em colaboração com o Ministério Nacional de Saúde e com a Direção Nacional de Saúde Pública de Angola, iniciou-se um estudo piloto com o objetivo principal de identificar agentes virais, nomeadamente adenovírus, astrovírus e norovírus, presentes em fezes de crianças com idade inferior a 5 anos com diarreia aguda, não provocada por rotavírus, que recorreram a várias unidades de saúde das províncias de Cabinda, Luanda, Huambo e Zaire em Angola.

O estudo teve como objetivos mais específicos:

1. Determinar a prevalência da infeção por adenovírus, astrovírus e norovírus na população acima mencionada; e
2. Proceder à caracterização genética das estirpes detetadas para avaliar a diversidade de genótipos daqueles vírus circulantes na população alvo.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 População estudada

O estudo foi realizado em Angola, nas províncias de Cabinda, Luanda, Huambo e Zaire. A população alvo do estudo foi crianças com idade inferior a cinco anos, de ambos os sexos, e que apresentassem um quadro de GEA (*i.e.* com diarreia, definida por três ou mais dejeções líquidas ou moles, num período de 24 horas, e/ou vómitos). As crianças foram atendidas na consulta de hospitais ou centros de saúde da sua área de residência.

As amostras de fezes foram colhidas em duas fases. Numa primeira fase de Junho a Agosto de 2012, durante o período de época seca, localmente designada por *cacimbo*, que em Angola se estende de Maio a Agosto, e numa segunda fase de Setembro a Outubro de 2013, na estação das chuvas, que decorre de Setembro a Abril.

Nas diversas unidades de saúde, a avaliação e a triagem clínica das crianças foram realizadas pelo enfermeiro/médico assistente, o qual tinha a responsabilidade de verificar se a criança preenchia os critérios definidos para a população alvo do estudo, explicar os objetivos do mesmo e pedir consentimento ao responsável legal/acompanhante da criança. Caso concordasse em colaborar no estudo, o responsável pela criança preenchia um formulário de informação e consentimento informado (Anexo 6.1), onde autorizava a recolha de uma amostra de fezes da criança e a utilização dos dados clínicos da mesma. Os dados clínicos foram obtidos pelo método de inquérito (Anexo 6.2), preenchido pelo enfermeiro, em colaboração com o responsável da criança. O protocolo de estudo, o questionário e o formulário de consentimento informado foram aprovados pelas Comissões de Ética do Instituto de Higiene e Medicina Tropical e de Angola.

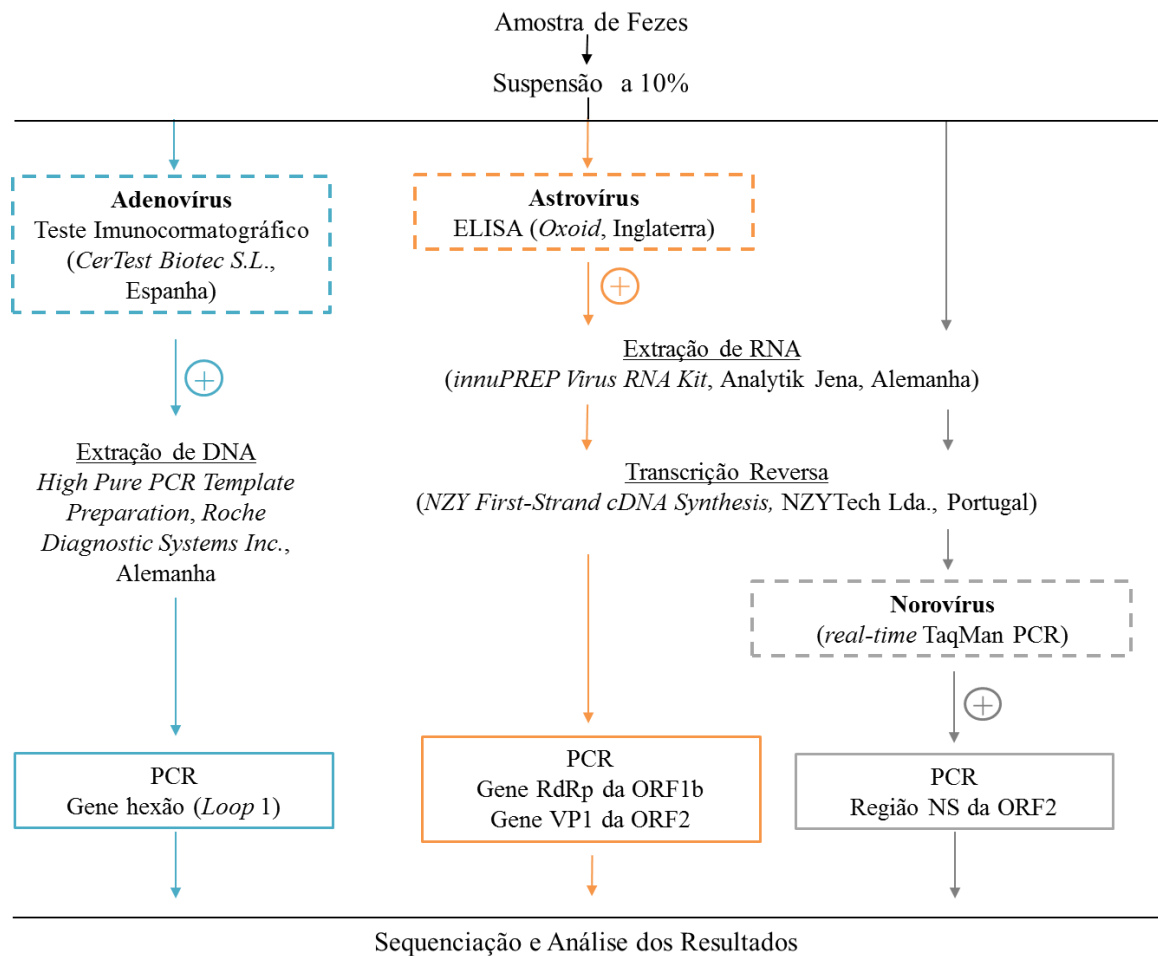


**Figura 2.1** - Mapa de Angola. As unidades de saúde onde foi efetuada a colheita de amostras estão assinaladas de 1 a 10, sendo 1 – Hospital Municipal de Chinga (HMC); 2 - Hospital Municipal de M'Banza Kongo (HMMK); 3 - Centro de Saúde Materno-Infantil de M'Banza Kongo (CSMI); 4 - Centro de Saúde da Paz (CSP); 5 - Hospital do Alto-Hama (AH); 6 - Hospital Municipal de Caála (C); 7 - Centro de Saúde de Calenga (CAL); 8 - Centro de Saúde do Casseque III (CIII); 9 - Hospital Municipal de Bailundo (B) e 10 - Centro de Saúde Materno-Infantil de Mineira (M).

## 2.2 Amostra

Num estudo realizado anteriormente, com o objetivo de determinar a prevalência da infeção e caracterizar os genótipos de RV circulantes nas diferentes regiões, 343 amostras foram testadas para este vírus, sendo 121 positivas. As restantes 222, provenientes de crianças com idade inferior a 5 anos com gastroenterite aguda causada por outro agente etiológico, foram usadas no presente estudo e analisadas para HAdVs, HAsVs e NoVs seguindo, genericamente, o fluxograma da Fig. 2.2.



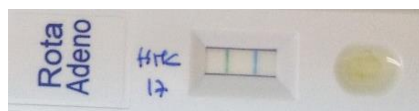


**Figura 2.2** - Fluxograma do procedimento usado na genotipagem de adenovírus, astrovírus e norovírus. As caixas a tracejado representam as etapas de detecção dos vírus nas amostras fecais, enquanto as caixas com linha contínua representam etapas de genotipagem.

## 2.3 Adenovírus

### 2.3.1 Detecção de HAdVs por teste rápido

De modo a detetar antígenos de HAdVs presentes nas amostras de fezes, foi utilizado o *kit* “*CerTest Rotavirus-Adenovirus*” (*CerTest Biotec S.L.*, Espanha), seguindo as instruções do fabricante. O teste qualitativo imunocromatográfico deteta simultaneamente a presença de antígenos de adenovírus e rotavírus.



**Figura 2.3** Amostra HMC17 positiva para adenovírus pelo *CerTest Rotavirus-Adenovirus*. A linha da esquerda é a de controlo do teste, e a linha do lado direito indica a presença de antígenos de adenovírus.

### 2.3.2 Extração de DNA viral

Inicialmente preparou-se uma suspensão de fezes a 10% em PBS. A extração do DNA viral foi realizada com o *kit* comercial “*High Pure PCR Template Preparation*” (*Roche Diagnostic Systems Inc.*, Alemanha), segundo as indicações do fabricante. O DNA foi isolado a partir de 200  $\mu$ l de suspensão de fezes, e posteriormente eluído em 200  $\mu$ l do tampão de eluição fornecido com o *kit*. O DNA extraído foi conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até posterior utilização.

### 2.3.3 Amplificação por *nested*-PCR de um fragmento do gene codificador da proteína do hexão

Na amplificação por *nested*-PCR foram efetuadas duas reações de PCR sucessivas, em que o produto obtido na primeira reação de PCR foi usado como matriz para a segunda reação. Na primeira reação, foram usados os *primers* Adhex-GT3F e Adhex-GT2R (Tabela 2.1), numa concentração de 0,8 pmoles/ $\mu$ l, 0,5 U de *Dream Taq DNA Polymerase* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Massachusetts, EUA) e 5 $\mu$ l de DNA matriz. Na segunda reação foram utilizados os *primers* Adhex-GT2F e Adhex-GT1R (Tabela 2.1) na mesma concentração e 1 $\mu$ l de produto da primeira reação de amplificação. O volume final foi de 25 $\mu$ l. As condições de amplificação, iguais para as duas reações, estão descritas Tabela 2.2.

**Tabela 2.1** *Primers* utilizados nas reações de amplificação do gene codificador da proteína do hexão de adenovírus (134)

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5' – 3')</i>	<i>Localização no genoma</i> <sup>1</sup>
Adhex-GT3F	CSGGNCAGGAYGCYTCGGRGTA	18884–18905
Adhex-GT2R	CACCCATGTTRCCWGTNCTGTT	19891-19912
Adhex-GT2F	AAYAARTTTAGRAAYCCCAC	18964–18983
Adhex-GT1R	TTRTCYCTRAADSCAATGTARTT	19868-19846

<sup>1</sup> A localização da sequência no genoma é referente a HAdV-2 (número de acesso GenBank J01917).

**Tabela 2.2** Condições de amplificação da primeira e segunda reações de PCR

	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo</b>	<b>Nº de ciclos</b>
<b>Desnaturação inicial</b>	95	3 min.	1
<b>Desnaturação</b>	95	30 seg.	40
<b>Hibridação</b>	50	30 seg.	
<b>Extensão</b>	72	1 min.	
<b>Extensão final</b>	72	10 min.	1

#### 2.3.4 Análise dos produtos de PCR

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose (0,7% p/v) em tampão TAE 0,5x (0,02M Tris-Acetato, 0,5mM EDTA) com 0,5µg/µl de brometo de etídio. Para determinar o tamanho dos fragmentos amplificados, utilizou-se um marcador de tamanhos moleculares (*GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder*, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, EUA) que correu em simultâneo com as amostras. A migração do produto de amplificação decorreu a uma corrente constante de 80 V, durante 1 hora e 30 minutos. A visualização dos produtos foi conseguida por exposição a luz ultravioleta e registada no aparelho *Gel-Doc XR System* da *BioRad* (Califórnia, EUA).

## **2.4 Astrovírus**

### **2.4.1 Detecção de astrovírus por ELISA**

Na deteção de antígenos de astrovírus por ELISA utilizou-se o *kit ProSpecT Astrovirus* (Oxoid, Inglaterra), seguindo as recomendações do fabricante.

Resumidamente, preparou-se uma suspensão a 10% de amostras de fezes em diluente da amostra fornecido com o *kit*. Aos poços da placa de ELISA, revestidos por anticorpos policlonais específicos de astrovírus, adicionou-se a suspensão preparada e, de seguida, o conjugado. Após incubação, procedeu-se às lavagens, e por último adicionou-se o substrato. De modo a garantir o controlo de qualidade do teste, um controlo negativo e outro positivo, foram utilizados nas mesmas condições das amostras.

Visualmente foi possível identificar as amostras positivas, devido à alteração de cor nos poços. Contudo, para resultados mais precisos, a placa de ELISA foi lida a 450 nm num espectrofotómetro leitor de placas.

### **2.4.2 Extração de RNA viral**

O RNA viral foi extraído a partir de 150 µl da suspensão de fezes em PBS, recorrendo ao *kit* comercial “*innuPREP Virus RNA Kit*” (Analytik Jena, Alemanha), segundo as recomendações do fabricante. O RNA retido nas colunas foi eluído em 60 µl de água livre de RNases, e armazenado a -80°C, até futura utilização.

### 2.4.3 Síntese do cDNA

De modo a sintetizar cDNA a partir do RNA extraído, foi efetuada uma reação de transcrição reversa (RT), utilizando o *kit* comercial *NZY First-Strand cDNA Synthesis* (NZYTech Lda., Lisboa, PT), seguindo as orientações do fabricante. Num tubo *RNase Free*, em gelo, preparou-se uma mistura de reação RT com 10 µl de *NZYRT 2× Master Mix*, (hexâmeros aleatórios, MgCl<sub>2</sub> e dNTPs), e 2 µl *NZYRT Enzyme Mix* (*NZY Reverse Transcriptase* e *NZY Ribonuclease Inhibitor*). A cada tubo de reação com 12 µl da mistura RT adicionou-se 8µl de RNA, previamente desnaturado a 80°C, durante 3 min. Para o controlo negativo da reação, o RNA viral foi substituído por água. A síntese de cDNA decorreu num termociclador (iCycler, BIO-RAD) a 25°C, 10 min, seguido de 50°C, 30 min e 85°C, 5min. Adicionou-se então 1 µl de *NZY RNase H*, e a mistura de reação foi incubada a 37°C, 20 min, e depois a 85°C, 5 min. As amostras foram posteriormente guardadas a -20°C.

### 2.4.4 Amplificação por PCR da ORF1b e da ORF2

A amplificação de uma sequência parcial do gene codificador da RdRp (ORF1b) foi efetuada através de uma reação de *hemi nested* PCR, utilizando os *primers* descritos na Tabela 2.3.

Na amplificação por *hemi-nested* PCR foram efetuadas duas reações de PCR sucessivas (Tabela 2.4), em que o produto obtido na primeira reação de PCR foi usado como matriz para a segunda reação. Na primeira reação, foram usados os *primers* panAV-F11, panAV-F12 e panAV-R1, 0,8 pmoles/µl cada, 12,5 µl da mistura *Supreme NZYTaq 2x Green Master Mix* (Nzytech, Lisboa, PT) e 1µl de cDNA. Na segunda reação foram utilizados os *primers* panAV-F21, panAV-F22 e panAV-R1, na concentração atrás referida, e 1µl do produto da primeira reação de amplificação. O volume final foi de 25µl.

**Tabela 2.3** *Primers* utilizados nas reações de amplificação do gene RdRp (ORF1b) de astrovírus (149)

<i>Primer</i>	Sequência (5' – 3')	Localização no genoma <sup>1</sup>
panAV-F11	GARTTYGATTGGRCKCGKTAYGA	3577-3599
panAV-F12	GARTTYGATTGGRCKAGGTAYGA	3577-3599
panAV-R1	GGYTTKACCCACATICCRAA	3976-3995
panAV-F21	CGKTAYGATGGKACKATICC	3592-3611
panAV-F22	AGGTAYGATGGKACKATICC	3592-3611

<sup>1</sup> A localização da sequência no genoma é relativa a HAsV-1 (número de acesso GenBank L23513).

**Tabela 2.4** Condições de amplificação do gene RdRp de astrovírus por *hemi-nested* PCR\*

	Temperatura (°C)	Tempo	Número de Ciclos
<b>Desnaturação Inicial</b>	95	1 min.	1
<b>Desnaturação</b>	95	30 seg.	30
<b>Hibridação</b>	50	30 seg.	
<b>Extensão</b>	72	30 seg.	
<b>Extensão Final</b>	72	3 min.	1

\*A 2ª reação decorreu nas mesmas condições, exceto o nº de ciclos de amplificação ter aumentado para 40.

A amplificação de uma sequência parcial da ORF2, codificadora da proteína da cápside, foi efetuada através de uma reação de PCR, utilizando os *primers* indicados na Tabela 2.5, e a mistura *Supreme NZYTaQ 2x Green Master Mix* (Nzytech, Lisboa, PT), de acordo com as indicações do fabricante. Como matriz usou-se 5µl de cDNA, sendo o

volume final de 25 µl. Efetuou-se uma segunda reação de PCR idêntica usando como matriz 2 µl do produto da 1ª reação.

**Tabela 2.5** *Primers* utilizados nas reações de amplificação da ORF2 dos astrovírus (150)

<i>Primer</i>	<i>Sequência (5' – 3')</i>	<i>Localização no genoma</i> <sup>1</sup>
Mon269	CAA CTC AGG AAA CAG GGT GT	4529-4548
Mon270	TCA GAT GCA TTG TCA TTG GT	4958-4977

<sup>1</sup> A localização da sequência no genoma é relativa a HAsV-1 (número de acesso GenBank L23513).

O processo de amplificação foi iniciado com um passo de desnaturação inicial (94°C, 2 min), seguindo-se os passos de desnaturação (94°C, 30 segundos), hibridação (54°C, 30 segundos) e extensão (72°C, 30 segundos), repetidos 40x. A reação de PCR terminou com um passo de extensão a 72°C durante 10 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1% p/v) como descrito em 2.3.4.

## 2.5 Norovírus

### 2.5.1 Detecção de norovírus por RT-PCR em tempo real

A detecção de norovírus foi realizada através de uma reação de PCR *multiplex* em tempo real, específica para a junção ORF1-ORF2, como descrito por Norgren *et al.* (2008), e que permite detetar e identificar norovírus GI e GII na mesma mistura de reação (151). Como matriz utilizou-se 2 µl do cDNA sintetizado na reação de transcrição reversa de 2.4.3, a partir do RNA extraído em 2.4.2.

Para a reação de amplificação foi utilizada a mistura *SensiFAST™ Probe Lo-ROX* (2x) (BIOLINE), de acordo com as instruções do fabricante. Os *primers* usados na reação foram NVG1F, NVG1R, NVG2F, COG2R (Tabela 2.6), numa concentração de 0,5 pmol/μl, a que foram também adicionadas duas sondas TaqMan®, uma específica para o genogruppo I (NoVG1 [1pmol/μl]), e outra para o genogruppo II (NoVG2 [1pmol/μl]) (Tabela 2.6), num volume total de 20 μl. A reação de PCR em tempo real foi executada no termociclador *7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*. De modo a garantir o controlo de qualidade do ensaio, foram utilizados duplicados de controlos positivos para cada genogruppo, e de controlos negativos.

O processo de amplificação foi iniciado com um passo de ativação da enzima (95°C, 10min.), seguindo-se os de desnaturação (95°C, 15 seg) e hibridação/extensão (60°C, 1min.), repetindo-se ao longo de 45 ciclos. Com base na magnitude do sinal gerado, foi possível detetar a presença de norovírus GI e/ou GII.

**Tabela 2.6** *Primers* e sondas utilizadas na reação de PCR em Tempo Real (151)

	Sequência (5' – 3')	Localização no genoma
<b>GI</b>		
<i>Primer</i> NVG1F	CGY TGG ATG CGN TTC CAT GA	5294–5313 <sup>1</sup>
<i>Primer</i> NVG1R	GTC CTT AGA CGC CAT CA TC	5397–5379 <sup>1</sup>
Sonda NoVG1	[6FAM]AG ATY GCG RTC YCC TGT CCA[BHQ1]	
<b>GI</b>		
<i>Primer</i> NVG2F	ATG TTY AGR TGG ATG AGR TTY TC	5012–5034 <sup>2</sup>
<i>Primer</i> COG2R	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	5100–5081 <sup>2</sup>
Sonda NoVG2	[JOE]TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT[BHQ1]	



<sup>1</sup> A localização da sequência no genoma é baseada no norovírus GI.1 (vírus Norwalk, número de acesso GenBank NC 001959); <sup>2</sup> A localização da sequência no genoma é baseada no norovírus GII.1 (número de acesso GenBank HCU07611).

### 2.5.2 Amplificação por PCR da região NS dos norovírus

A amplificação da sequência da região NS de norovírus GI foi efetuada através de uma reação de PCR, utilizando o *primer forward* NVG1F (Tabela 2.6) e o *primer reverse* G1SKR (5'- CCA ACC CAR CCA TTR TAC A-3' 5652-5671 nt), 0,5 pmol/μl de cada, e a mistura *Supreme NZYTaQ 2x Green Master Mix* (Nzytech, Lisboa, PT), de acordo com as indicações do fabricante. Foram realizadas duas reações de PCR sucessivas com o mesmo par de *primers*, utilizando-se 1 μl de cDNA na primeira reação e na segunda 1,5 μl do produto amplificado na primeira. A amplificação iniciou-se com um passo de desnaturação (94°C, 15 min), seguindo-se os passos de desnaturação a 94°C (30 seg), hibridação a 55°C (30 seg) e extensão a 72°C (60 seg), repetidos 35 ciclos. O PCR terminou com uma etapa de extensão a 72°C durante 5 min.

Para a amplificação da sequência NS de norovírus GII também se utilizou a mistura *Supreme NZYTaQ 2x Green Master Mix* (Nzytech, Lisboa, PT), de acordo com as indicações do fabricante. Na primeira reação de *hemi-nested* PCR, os *primers* COG2F (5' - ATG TTY AGR TGG ATG AGR TTY TC -3', nt 5012-5034) e G2SKR (5'- CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT- 3', nt 5367-5389) foram adicionados para uma concentração final de 0,5 pmol/μl. Utilizaram-se 2 μl de cDNA matriz, sendo o volume final de reação de 20 μl. Na segunda reação de *hemi-nested* PCR, foram utilizados os *primers* G2SKF (5' - CNT GGG AGG GCG ATC GCA A -3', nt 5046-5064) e GS2KR, na mesma concentração, e 2 μl do produto amplificado na primeira reação.

Na primeira reação de *hemi-nested* PCR, a amplificação iniciou-se com um passo de desnaturação inicial a 95°C (10 min), seguindo-se os passos de desnaturação a 95°C (30 seg), hibridação a 57°C (30 seg) e extensão a 72°C (2 min), repetidos 40 vezes. O PCR terminou com uma etapa de extensão final a 72°C durante 5 min. A segunda reação

decorreu nas mesmas condições, exceto a temperatura de hibridação ser de 58°C. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose (2% p/v).

## **2.6 Clonagem dos Produtos de PCR no Vetor Plasmídico *pGEM®-T Easy***

Os produtos de PCR com bandas inespecíficas e/ou quantidade reduzida do fragmento de interesse foram clonados no plasmídeo *pGEM®-T Easy* (Promega, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, a mistura de ligação consistiu em 5µl de tampão, 1µl de solução do plasmídeo *pGEM®-T Easy* (50ng/µl), 1µl de T4 DNA ligase e 3µl do produto de PCR a clonar. De modo a obter uma maior taxa de transformantes, as ligações decorreram a 4°C, durante a noite.

Para a preparação e transformação de células competentes, uma cultura de *Escherichia coli* JM109 foi crescida durante a noite, a 37°C, com agitação (220 rpm), em meio líquido de Luria Bertani (LB). Na manhã seguinte, fez-se uma diluição 1:100 da cultura saturada, em 20 ml LB. A cultura foi incubada a 37°C, com agitação, até uma densidade ótica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) de 0,3-0,5. A cultura foi então centrifugada a 3000 xg, durante 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento ressuspenso cuidadosamente em 1 ml de TSS frio (10% PEG, 5% DMSO, 50 mM MgSO<sub>4</sub>, em meio LB).

A um tubo *ependorf* de 1,5 ml arrefecido em gelo, foram adicionados 100 µl da suspensão de células e 5 µl da mistura de ligação. A mistura manteve-se em gelo durante 30 min, sendo em seguida submetida a choque térmico durante 90 segundos a 42°C e colocada novamente em gelo 5 min. Adicionaram-se então 900 µl de meio LB líquido à suspensão, seguindo-se uma incubação a 37°C, com agitação suave (100 rpm) durante 90 min.

Numa placa de meio LB sólido, *i.e.* meio LB líquido gelificado com 5% de agar, suplementado com X-Gal (80 µg/ml), IPTG (20 µg/ml) e ampicilina (100 µg/ml),

procedeu-se ao espalhamento de 100 µl da suspensão bacteriana transformada. As placas foram incubadas a 37°C, durante a noite.

Repicaram-se colónias brancas, *i.e.* transformantes possuindo um plasmídeo com o gene da β-galactosidase interrompido pela ligação de um inserto, para meio LB líquido (3ml) suplementado com ampicilina (100 µg/ml) e incubaram-se, a 37°C, durante a noite, com agitação constante. As bactérias foram colhidas por centrifugação a 13500rpm, 1 min, o sobrenadante decantado e o sedimento ressuspense em 300µl de TE (10mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4) com 10µg/ml de RNase.

A cada amostra foram adicionados 300 µl de solução de lise (NaOH 200mM/1%SDS), que se misturaram por inversão, seguiu-se a neutralização com 300 µl de 3M NaOAc, pH 5,5, a 4°C), igualmente misturado por inversão. A suspensão foi centrifugada a 16000 xg, 15 min, e o sobrenadante transferido para novos tubos, onde o DNA plasmídico em suspensão foi precipitado, através da adição de igual volume de isopropanol e centrifugação a 16000 xg, 30 min. O sedimento foi lavado com 500 µl de etanol a 70% (v/v), seco por centrifugação sob vácuo e ressuspense em 30 µl de água.

Para a identificação dos transformantes contendo o inserto do tamanho pretendido, procedeu-se à digestão enzimática dos plasmídeos extraídos com a enzima de restrição *EcoRI* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*, Massachusetts, EUA). A mistura de reação foi feita de acordo com as indicações do fabricante. Após digestão, analisou-se o perfil eletroforético dos produtos em gel de agarose (1% p/v). Os plasmídeos com o tamanho de inserto correto foram selecionados para sequenciação.

## 2.7 Purificação e Sequenciação dos Produtos de PCR

De modo a ser possível sequenciar os produtos obtidos por PCR, muitos deles tiveram de ser submetidos a um processo de purificação após separação electroforética e remoção da fatia de gel com a banda do tamanho esperado. Para tal, utilizou-se o *kit* “*Zymoclean™ Gel DNA Recovery*” (*Zymo Research*, EUA), seguindo indicações do fabricante. No caso dos adenovírus e astrovírus, o DNA foi eluído em 10 µl de *DNA*

*Elution Buffer*. Para verificar o grau de purificação dos produtos obtidos, estes foram analisados por eletroforese em gel de agarose. A purificação dos produtos de PCR de norovírus foi realizada pela empresa STAB VIDA (Caparica, Portugal) diretamente a partir da mistura de reação.

A sequenciação dos produtos amplificados foi realizada também na STAB VIDA, pelo método de *Sanger*. Para tal, foram utilizados os *primers* GT2F para os adenovírus, panAV-R1 e Mon69 para os astrovírus, e NVG1 e G2SKF para os norovírus. Para a sequenciação dos produtos clonados em *pGEM®-T Easy*, foi utilizado o *primer* T7.

## **2.8 Análise estatística**

Todos os dados recolhidos dos questionários foram utilizados na construção de uma base de dados. Os dados foram analisados com o *software* SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*), versão 17.0 (IBM SPSS, Chicago, USA). Para a análise e comparação das variáveis recorreu-se a testes de frequência, Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), T-test, teste exato de Fisher e ANOVA. Nesta análise estatística, o limite de significância estatística considerado foi de 95% ( $p < 0,05$ ).

Os parâmetros antropométricos foram calculados com recurso ao programa *WHO Anthro*, versão 3.2.2 (WHO, Suíça), disponível para *download* no *site* da OMS (152). No programa são introduzidos dados como a data de nascimento, o sexo, o peso, a altura e a data em que a criança recorreu à unidade de saúde. O programa calcula assim, o Índice de Massa Corporal (IMC), e os *Z-scores* relativos ao estado de malnutrição (peso em relação à idade), estado de nanismo (comprimento em relação à idade) e estado de magreza (peso em relação à altura). Segundo este sistema de classificação, quando o valor de *Z-score* para o estado de malnutrição for  $< -2$  SD (*standard deviation*) ou  $< -3$ SD, a criança é considerada malnutrida ou gravemente malnutrida, respetivamente.

A escala do cálculo de gravidade dos episódios de gastroenterite teve como base o sistema de 20 pontos, descrito por Nakagomi *et al.* (153). A pontuação foi atribuída segundo a Tabela 6.1, em anexo.

## 2.9 Análise de sequências nucleotídicas

Os cromatogramas correspondentes às diversas reações de sequenciação foram enviados pela STAB VIDA. Os mesmos foram analisados, e as sequências nucleotídicas, se necessário, corrigidas manualmente através do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*, versão 7.2.5 (*Ibis Biosciences*, Califórnia, USA), disponível para *download* no *site* (154). Na edição de algumas sequências foi também utilizado o programa *GeneDoc*, versão 2.7 (155).

As sequências editadas dos três vírus foram sujeitas a uma pesquisa no programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponível no *site* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (156). As sequências em estudo foram comparadas com sequências inseridas na base de dados do NCBI, de modo a identificar as que apresentavam maior homologia. Através da percentagem de similaridade, foi possível determinar o genótipo provável das sequências dos vírus, e identificar as sequências de referência a utilizar na construção de árvores filogenéticas, designadamente as que apresentam maior identidade ou que circulam em áreas geograficamente próximas.

As sequências nucleotídicas dos norovírus, para além de terem sido sujeitas a uma análise BLAST, foram também analisadas na ferramenta RIVM, (do holandês, *Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu*), versão 1.0, disponível no *site* NoroNet (<http://www.rivm.nl/en/Topics/N/NoroNet>) (157). Com esta ferramenta foi possível determinar o genótipo provável de norovírus, e quais sequências com maior identidade, relativamente a cada uma das sequências em estudo.

Para confirmar os resultados de genotipagem obtidos nas ferramentas bioinformáticas, foram construídas árvores filogenéticas para sequências parciais do

gene do hexão dos adenovírus, da ORF1b e da ORF2 dos astrovírus, e para a região NS da ORF2 dos genogrupos I e II dos norovírus. Para a construção das diferentes árvores filogenética, as sequências nucleotídicas em estudo foram alinhadas com sequências de referência correspondentes para os diferentes genótipos de cada vírus. Para tal, foi utilizada a aplicação *ClustalW*, do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*. Os alinhamentos múltiplos obtidos foram depois utilizados no *software* MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), versão 6, disponível para *download* no *site* (158). O método utilizado foi o *Neighbor-Joining* com o modelo de 2 parâmetros de Kimura. Nas preferências de análise foi também selecionada a opção de deleção completa, sempre que no alinhamento existiam espaços. A robustez de inferência filogenética e, consequentemente, das topologias sugeridas foi avaliada através do método de *bootstrapping*, com base em 1000 amostragens aleatórias, considerando-se estatisticamente significativos valores iguais ou superiores a 75%.

As sequências nucleotídicas obtidas no decurso do trabalho encontram-se em fase de submissão à base de dados GenBank.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Caracterização Demográfica e Clínica da População Estudada

No estudo da infeção por adenovírus, astrovírus e norovírus foram analisadas 222 amostras de fezes de crianças com sintomatologia de GEA, não infetadas por rotavírus, que recorreram a unidades de saúde em quatro províncias de Angola em 2012 e 2013. A todas as crianças que participaram no estudo foi realizado um inquérito demográfico e clínico (Anexo 6.2). Contudo, dos 222 inquéritos realizados, apenas se teve acesso a 108 (48,6% da amostragem) (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1** Distribuição do número de crianças com GEA e respetivos inquéritos por instituição de saúde Angolana (2012 e 2013)

	Número de Crianças	Número de Inquéritos Disponíveis
<b>Cabinda</b>		
Hospital Municipal de Chinga (HMC)	35	34
<b>Zaire</b>		
Hospital Municipal de M'Banza Kongo (HMMK)	10	5
Centro de Saúde Materno-Infantil de M'Banza Kongo (CSMI)	6	6
<b>Luanda</b>		
Centro de Saúde da Paz (CSP)	17	17
<b>Huambo</b>		
Hospital do Alto-Hama (AH)	15	4
Hospital Municipal de Caála (C)	55	14
Centro de Saúde de Calenga (CAL)	6	6
Centro de Saúde do Casseque III (CIII)	3	3
Hospital Municipal de Bailundo (B)	30	10
Centro de Saúde Materno-Infantil de Mineira (M)	45	9
<b>Total</b>	<b>222</b>	<b>108</b>

Relativamente às características demográficas, 55% (57/103) das crianças inquiridas pertencem ao sexo masculino e 45% (46/103) ao sexo feminino. A idade das crianças variou num intervalo de 1 a 51 meses, sendo a média de idades de 12,4 meses. A maioria das crianças, 89,8% (97/108), encontrava-se na faixa etária de 0 a 24 meses, inclusive, e apenas 10,2% (11/108) tinha mais de 24 meses. Em relação ao local de habitação, 77% (81/105) das crianças residia em meio urbano, e 23% (24/105) em meio rural (Tabela 3.2).

A nível alimentar, 74,8% (80/107) das crianças estava a ser amamentada. Deste grupo, 84,3% (43/51) ingeria outros alimentos para além do leite materno, e 15,7% (8/51), era exclusivamente amamentada. Cerca de 25% (27/107) das crianças não estava a ser amamentada (Tabela 3.2).

Em termos de características clínicas, todas as crianças tinham diarreia, uma vez que este era um dos fatores de inclusão do estudo. Em média, as crianças tinham diarreia durante 3,4 dias e cerca de 3,5 episódios por dia. Cerca de metade da população em estudo tinha vômitos (46/103), com duração média de 2,5 dias e 2,5 episódios em 24h, respetivamente. Apenas 11,8% (11/93) das crianças possuía uma temperatura axial igual ou superior a 37,6°C e mais de metade das crianças não apresentava desidratação (53,5%) nem malnutrição (72,2%). O estado de atividade das crianças foi também avaliado, e cerca de 25% (25/103) apresentava um estado de atividade “reduzido”. Em média, a população apresentava um índice de massa corporal (IMC) de 16,3 e um grau de gravidade de diarreia de 6,71 (Tabela 3.2). A análise do grau de gravidade da diarreia mostrou que as crianças com idade igual ou inferior a 24 meses apresentavam um valor médio para a gravidade dos sintomas ligeiramente superior (6,81 pontos), quando comparado com crianças com mais de 24 meses (5,85 pontos), contudo, estes resultados não são estatisticamente significativos (*p-value* 0,392).

Efetuiu-se uma avaliação do estado nutricional das crianças e verificou-se que mais de metade das crianças apresentava peso e estatura normais para a idade e um peso normal para a altura ( $Z > -2SD$ ). Porém, 26,2% das crianças apresentava um peso baixo em relação à idade, 36,2% uma estatura baixa em relação à idade e 26,9% um peso baixo em relação à altura ( $-3SD < Z < -2SD$ ). Nenhuma criança se encontrava em estado grave ( $Z < -3SD$ ) para os três parâmetros avaliados (Anexo 6.4).



**Tabela 3.2** - Características da população alvo e relação com a infeção por adenovírus, astrovírus e/ou norovírus

Varáveis	Categorias	Nº de crianças inquiridas (%)	Crianças infetadas (%)	<i>p-value</i>
Características Demográficas				
Género (n=103)	Masculino	57 (55,3)	9 (29)	0,001*
	Feminino	46 (44,7)	22 (71)	
Idade (n=108)	0-24	97 (89,8)	29 (85,3)	0,317*
	>24	11 (10,2)	5 (14,7)	
Local de Residência (n=105)	Urbano	81 (77,1)	26 (81,3)	0,618*
	Rural	24 (22,9)	6 (18,8)	
Características da Alimentação				
Amamentação (n=107)	Sim	80 (74,8)	23 (67,6)	0,339*
	Não	27 (25,2)	11 (32,4)	
Amamentação e ingestão de outros alimentos? (n=51)	Leite materno e outros alimentos	43 (84,3)	12 (92,3)	0,662*
	Amamentação exclusiva	8 (15,7)	1 (7,7)	
Características Clínicas				
Febre (n=93)	<37,6°C	82 (88,2)	25 (96,2)	0,173*
	≥37,6°C	11 (11,8)	1 (3,8)	
Se ≥37,6°C, duração média (dias)		2,8	2,5	0,645 <sup>#</sup>
Diarreia				
Duração média (dias)		3,4	3,0	0,193 <sup>#</sup>
Nº vezes/24horas (média)		3,5	3,7	0,396 <sup>#</sup>
Vómitos (n=103)	Sim	46 (44,7)	14 (42,4)	0,833*
	Não	57 (52,8)	19 (57,6)	
Duração média (dias)		2,5	2	0,155 <sup>#</sup>
	Nº vezes/24horas (média)		2,5	
Desidratação (n=101)	Sim	47 (46,5)	14 (43,8)	0,831*
	Não	54 (53,5)	18 (56,3)	
Atividade (n=103)	Normal	78 (75,7)	26 (78,8)	0,806*
	Reduzida	25 (24,3)	7 (21,2)	
Malnutrição (n=97)	Sim	27 (27,8)	8 (26,7)	0,535*
	Não	70 (72,2)	22 (73,3)	
Índice de Massa Corporal (média)		16,3 ± 4,5	15 ± 3,6	0,089 <sup>#</sup>
Grau de Gravidade da diarreia <sup>a)</sup> (média)		6,71 ± 3,7	6,03 ± 2,9	0,187 <sup>#</sup>

<sup>a)</sup> Classificação segundo a escala de 20 pontos de Nakagomi (153)

\* Foi utilizado o teste estatístico exato de Fisher para o cruzamento de dados e para determinar o valor de significância dos mesmos

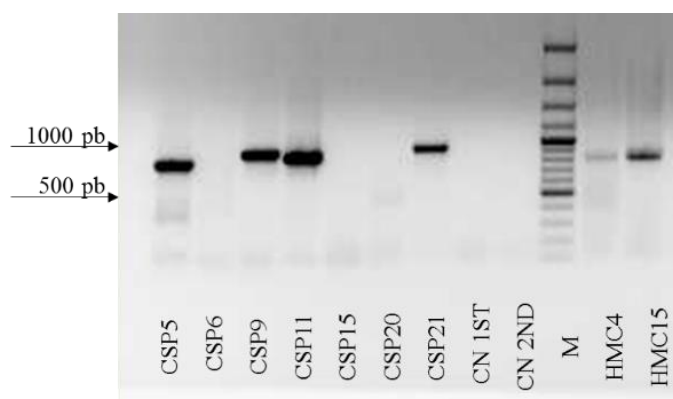
<sup>#</sup> Foi utilizado o teste estatístico T-Student para comparar valores médios e determinar o valor de significância dos mesmos

O limite de significância estatística é de 5%. Os valores de  $p < 0,05$  estão assinalados a negrito.

### 3.2 Prevalência da infeção por adenovírus, astrovírus e norovírus

Para avaliar a presença de adenovírus, astrovírus e norovírus nas amostras de fezes de crianças em Angola, recorreu-se a testes imunológicos de deteção de antígenos (HAdVs e HAsVs) e a metodologias de biologia molecular, como o RT-PCR em tempo real (rt-RT PCR) para os NoV e PCR convencional para HAdVs.

Relativamente aos adenovírus, das 222 amostras em estudo, 154 tinham sido previamente testadas por teste rápido imunocromatográfico para deteção de antígenos de RV e HAdV, das quais 12 deram um resultado positivo. Das restantes 68 amostras, 45 foram testadas com mesmo teste rápido, sendo uma amostra positiva para adenovírus. Nas outras 23, a quantidade reduzida de amostra não permitia a realização de teste rápido e a caracterização molecular, tendo-se optado pela extração de DNA e *nested*-PCR, com *primers* usados na genotipagem e que amplificam um fragmento do gene codificador da proteína do hexão. No total, foi possível obter produto com o tamanho esperado (~ 900 pb) para 11 amostras.



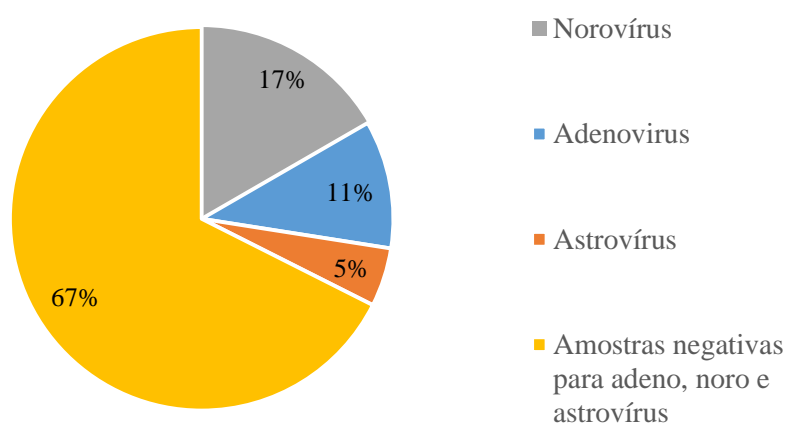
**Figura 3.1** Padrão electroforético dos produtos amplificados obtidos por *nested*-PCR para deteção de adenovírus; M = Marcador de tamanho molecular *GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder*, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, EUA; CN1st = Controlo Negativo com produto de reação proveniente da 1ª reação de PCR; CN2nd = Controlo Negativo da 2ª reação.

No conjunto, os dois procedimentos permitiram detetar 24 amostras positivas para adenovírus, correspondendo a uma prevalência de 11%.

A utilização de um teste de ELISA específico para antígenos de HAsVs revelou a presença destes vírus em 11 das 222 amostras analisadas, correspondendo a uma prevalência de 5%.

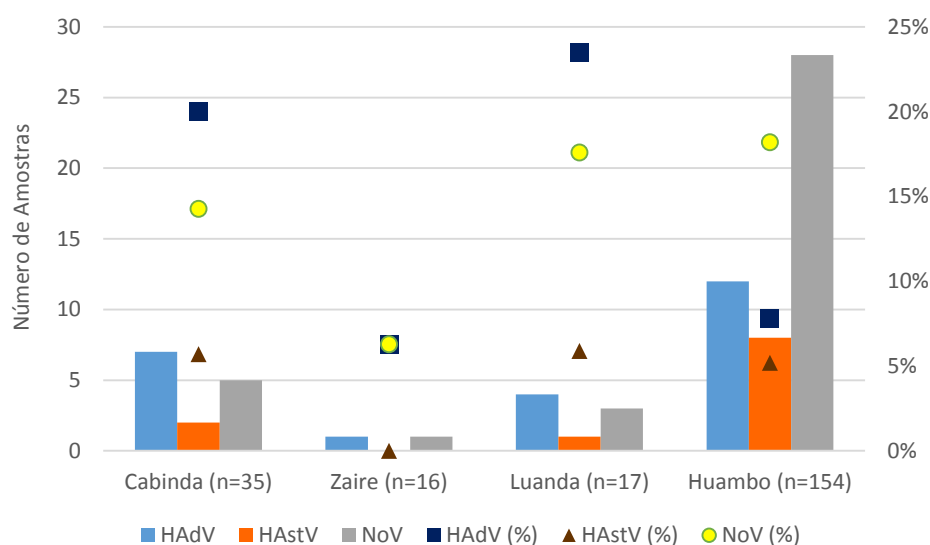
Para os NoVs, o método de deteção utilizado foi rt-RT PCR. Para além de detetar a presença de NoVs, a técnica permitiu também diferenciar se as amostras positivas pertenciam ao genogruppo I (GI) ou II (GII), uma vez que combina duas sondas TaqMan<sup>®</sup> específicas de genogruppo num ensaio multiplex. As amostras foram consideradas positivas sempre que em duas réplicas se obtinha amplificação com valores de Ct inferiores a 40. Assim, foi possível detetar 37 amostras positivas para NoVs, correspondendo a 17% do total das amostras analisadas. A maioria dos norovírus detetada foi identificada como sendo do genogruppo II (81%), sendo os restantes do genogruppo I (19%) (Anexo 6.5).

A Fig. 3.2 é uma representação gráfica das prevalências dos três agentes virais estudados. No total das amostras, 29,7% (66/222) revelaram a presença de um ou mais dos vírus analisados. Na maioria destas amostras (n=32, 14,4%) foi detetado apenas norovírus, seguido de adenovírus (n=19, 8,6%) e astrovírus (n=9, 4%). Seis das amostras (3%) apresentaram infeção mista, com combinações diferentes de dois dos três agentes estudados, sendo a coinfeção mais comum entre adenovírus e norovírus (4/6).



**Figura 3.2** - Representação gráfica das prevalências (%) de adenovírus, astrovírus e norovírus, em crianças <5 anos, em Angola (2012 e 2013).

As prevalências dos três vírus variaram consoante a província de Angola analisada (Figura 3.3). Em Cabinda e Luanda o vírus mais frequentemente identificado foi o adenovírus (20% e 24%, respetivamente), enquanto no Huambo foi o norovírus (18,2%). Na província do Zaire, a prevalência de adenovírus e norovírus foi equivalente (6,3%).



**Figura 3.3** Distribuição da prevalência da infecção (%) por adeno, astro e norovírus de acordo com a região de colheita das amostras, em crianças <5 anos, com GEA, Angola, 2012 e 2013. As figuras geométricas representam as prevalências dos vírus nas diversas regiões.

### 3.3 Caracterização epidemiológica da infecção por adenovírus, astrovírus e norovírus

Dos 108 inquéritos analisados, 34 correspondiam a crianças infetadas com adenovírus, astrovírus e/ou norovírus, e 74 a crianças com gastroenterite devido a outro agente etiológico não identificado.

O número de casos de gastroenterite foi maior entre os rapazes (55,3%), contudo a nível de crianças infetadas pelos vírus analisados, 71% eram raparigas ( $p=0,001$ ) (Tabela 3.2). No caso da infecção por adenovírus, verificou-se que as crianças do sexo

feminino tinham maior probabilidade de ser infetadas com estes vírus comparativamente com as crianças do sexo masculino (Tabela 6.4, Anexo 6.6). Nos casos de infeção por adenovírus, norovírus e/ou astrovírus, verificou-se que a infeção é mais comum em crianças com idade igual ou inferior a 24 meses, mas a diferença não tem significado estatístico (94,1%,  $p=1,000$ , 82,4%,  $p=0,374$  e 75%,  $p=0,353$ , respetivamente) (Tabela 3.2, e Tabela 6.4 do Anexo 6.6).

No que respeita à amamentação, a deteção de adenovírus, norovírus ou astrovírus foi inferior no grupo de crianças exclusivamente amamentadas comparativamente com as que, para além da amamentação, ingeriam outros alimentos. Verificou-se que das crianças sujeitas exclusivamente a amamentação, apenas uma estava infetada, neste caso com norovírus.

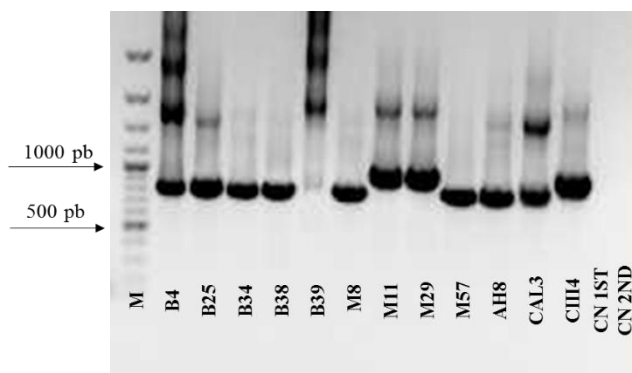
Em termos clínicos, 96,2% das crianças infetadas não tinha febre (temperatura  $<37,6^{\circ}\text{C}$ ). A única criança com febre possuía amostra positiva para adenovírus, e a febre teve a duração de dois dias e meio. As crianças infetadas com astrovírus apresentaram durações médias de diarreia e de vômitos mais elevadas, 4,7 e 3,5 dias, respetivamente, quando comparadas com as de crianças infetadas com adenovírus ou norovírus. O número diário de episódios de diarreia foi semelhante entre as crianças infetadas pelos três vírus em estudo. Já o número de episódios de vômitos por dia foi superior no caso das crianças infetadas por astrovírus (média de 5 episódios/24h). A maioria das crianças infetadas, 78,8%, apresentava um estado de atividade normal, e cerca de 43% e 73% apresentavam indícios de desidratação e malnutrição, respetivamente. Apesar de a diferença não ser estatisticamente significativa ( $p=0,573$ ) todas as crianças infetadas com astrovírus aparentavam estar malnutridas. Quanto à média de IMC, quando comparada entre todas as crianças inquiridas e as crianças infetadas, é possível constatar que o valor é inferior neste último grupo, contudo a diferença não é estatisticamente significativa ( $p=0,089$ ) (Tabela 3.2). A classificação desta variável varia consoante o sexo e a idade, mas valores de IMC inferiores a 15 indicam que a criança tem peso abaixo do que seria esperado. Neste estudo, as crianças infetadas apresentaram valores médios de  $15\pm 3,6$ , sendo 8,3 o valor mais baixo, observado numa criança infetada com norovírus (dados não apresentados). Quando se considera a escala de Nakagomi, verificou-se que a gravidade dos sintomas associados a diarreia é independente do facto

das crianças estarem ou não infetadas ( $p=0,187$ ), e do tipo de agente presente ( $p=0,214$ ,  $p=0,878$  e  $p=0,592$ ) (Tabela 3.2 e Tabela 6.4).

A comparação dos índices de malnutrição com a infeção por adenovírus, astrovírus e/ou norovírus não gerou nenhuma correlação significativa (Tabela 6.2, do Anexo 6.4).

### 3.4 Diversidade de genótipos de adenovírus circulantes

Para determinar o genótipo das estirpes de HAdVs detetadas, procedeu-se à amplificação da sequência parcial (*loop 1*) do gene codificador do hexão em duas reações de PCR sucessivas, que deram origem a produtos com aproximadamente 1000 pb e 900 pb, respetivamente, seguindo-se a sequenciação dos produtos de PCR e análise filogenética. As amostras positivas por teste rápido imunocromatográfico ( $n=13$ ) deram origem a produtos de PCR com migrações compatíveis com o tamanho esperado. Na Fig. 3.4, pode-se observar um perfil de migração de produtos da 2ª reação de PCR. As amostras M11, M29 e CIII4 apresentaram um tamanho ligeiramente superior ao das restantes amostras (Fig. 3.4). O arrastamento observado para a amostra B39 é, provavelmente devido à elevada carga viral da amostra. Quando o DNA matriz desta amostra foi diluído 50x antes da amplificação, o arrastamento atenuou-se e surgiu uma banda forte com o tamanho esperado. As múltiplas bandas inespecíficas observadas na maioria das amostras resultam, provavelmente, da degenerescência dos *primers* e da temperatura de hibridação relativamente baixa (50°C) usada no PCR. A presença destes produtos inespecíficos, principalmente quando fortemente abundantes, determinou a separação electroforética em gel de agarose do produto de interesse e sua purificação antes da sequenciação. No total foram enviados para sequenciar 24 produtos de PCR, dos quais obtiveram-se sequências com qualidade para serem subsequentemente analisadas.



**Figura 3.4** – Padrão de migração electroforética em gel de agarose dos produtos da 2ª reação de *nested*-PCR para amplificação da sequência codificadora da *loop 1* do hexão de adenovírus; M = Marcador de tamanho molecular *GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder*, *Thermo Fisher Scientific Inc.*, Massachusetts, EUA; CN = Controlo Negativo da 1ª reação; CN1st = Controlo Negativo com produto de reação proveniente da 1ª reação e CN2nd = Controlo Negativo da 2ª reação.

As sequências obtidas foram editadas e submetidas a uma pesquisa de homologia, onde foram comparadas com sequências disponíveis na base de dados do NCBI, através do algoritmo *Nucleotide BLAST*. A identificação dos genótipos fez-se através da comparação entre as sequências em estudo e as sequências de genótipo conhecido que apresentavam um maior grau de semelhança (ID, de identidade), na extensão da sequência em análise e os resultados encontram-se descritos no Anexo 6.7. As sequências em estudo apresentaram uma identidade  $\geq 83\%$  com as sequências de referência. Por análise BLAST foi possível identificar, provisoriamente, 11 genótipos diferentes de adenovírus.

De modo a confirmar estes resultados e também para estabelecer relações filogenéticas entre as sequências em estudo e as depositadas nas bases de dados, construiu-se uma árvore filogenética para a sequência parcial do gene codificante do hexão (Fig. 3.5). Nos alinhamentos foram utilizadas 24 sequências nucleotídicas de adenovírus Angolanos e as estirpes de referência usadas foram, maioritariamente, as identificadas na análise BLAST.

Através da análise da árvore filogenética da Fig 3.5 foi possível observar a distribuição das sequências nucleotídicas de amostras Angolanos por 11 grupos de sequências distintos, suportados por valores de *bootstrap* de 100%, correspondentes aos

genótipos HAdV-1, -2, -5, -9, -15/29, -18, 26, -27, -40, -41 e -61, tendo-se confirmado por inferência filogenética os resultados da pesquisa BLAST. Os onze genótipos identificados correspondem a quatro espécies diferentes, A, C, D e F. Na Fig. 3.6 está apresentada graficamente a prevalência dos diferentes genótipos identificados.

A maioria das estirpes de adenovírus Angolanas (n=11) pertence à espécie F, da qual fazem parte os genótipos 40 e 41 conhecidos como adenovírus entéricos. Os vírus M8, B34, B4 e AH8 apresentam 100% de similaridade com a estirpe *Dugan* circulante no Japão (AB330121/Hu/AdV-40/Dugan/JPN/2000) e 99,8% com a estirpe Thai15139 da Tailândia (FJ228470/Hu/AdV-40/Thai15139/THA/2003), ambas pertencentes ao genótipo HAdV-40. Os adenovírus classificados como HAdV-41 são mais abundantes (n=7). Pela topologia da árvore foi possível observar a formação de dois subgrupos de HAdV-41, GTC-1 e GTC-2 (GTC, *genome type cluster*). Em GTC-1, as sequências HMC8, HMC15, HMC27 e HMC28 apresentam similaridade  $\geq 99,2\%$  relativamente à estirpe *Tak* (DQ315364/Hu/AdV-41/Tak/NED/2008). Em GTC-2 surgem as sequências B38 e M57 que estão estreitamente relacionadas com uma sequência de adenovírus da Índia (HQ005281/Hu/AdV-41/500860/IND/2008). Neste *cluster* a sequência nucleotídica B25 apresenta maior similaridade (99,6%) com uma estirpe de origem Alemã (EF110983/Hu/AdV-41/G-A13/GER/2007).

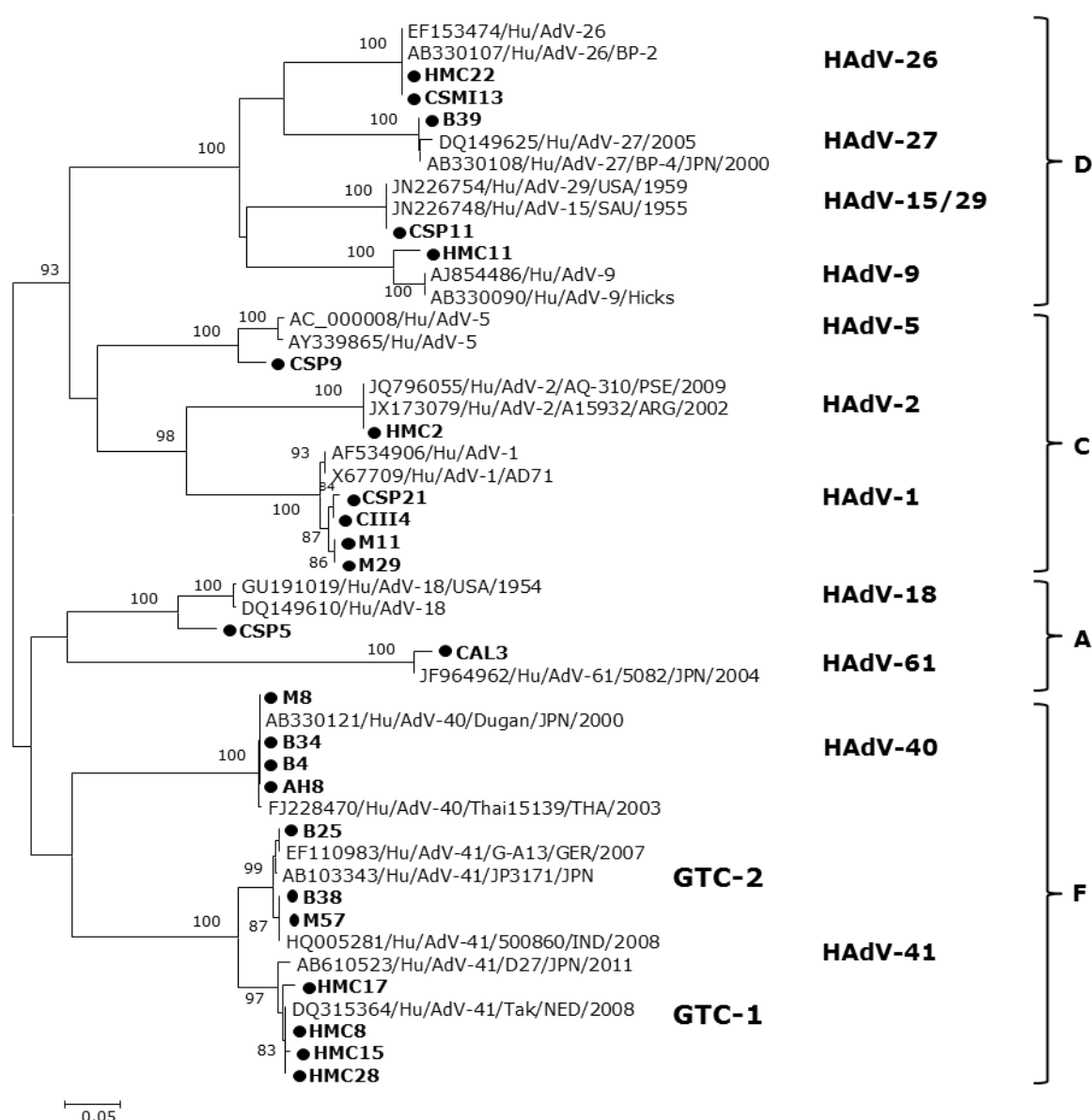
Em relação à espécie A dos adenovírus, onde estão incluídas apenas duas sequências virais Angolanas, a sequência CSP5 agrupa-se com as sequências de referência do genótipo 18. Quanto à amostra CAL3, por BLAST foi classificada como HAdV-8 ou -61. Por análise filogenética confirmou-se esta sequência como sendo de HAdV-61, uma vez que está estreitamente relacionada com JF964962/Hu/AdV-61/5082/JPN/2004, única referência para este genótipo nas bases de dados. Pela análise de distâncias, na região analisada CAL3 é 98,1% similar a este vírus identificado no Japão.

Na espécie C de adenovírus, foram identificadas no total sequências destes vírus em seis amostras Angolanas, as quais se agrupam com sequências dos genótipos HAdV-1, -2 e -5. A amostra HMC2 forma um grupo monofilético com as sequências de referência para o genótipo HAdV-2. Já as amostras genotipadas como HAdV-1 (CSP21, CIII4, M11, M29) formam um subgrupo, suportado por um valor de *bootstrap* de 87%,

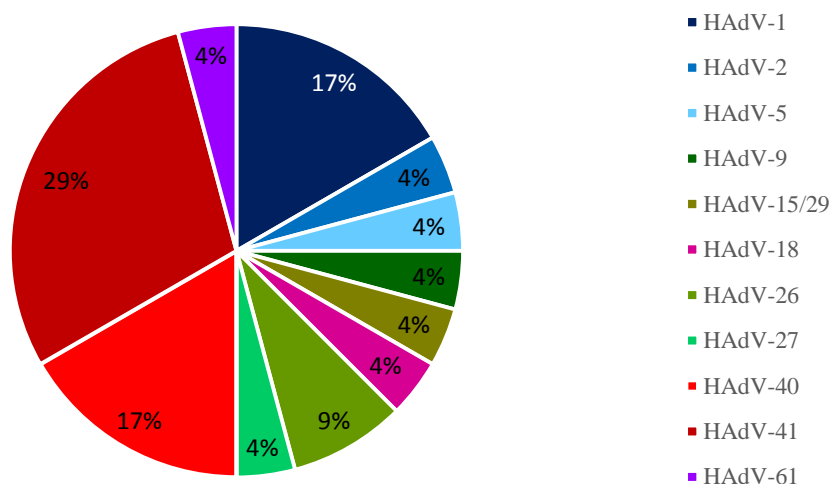


separado das sequências de referência. Curiosamente este grupo de sequências apresentava um produto de PCR com um tamanho ligeiramente superior ao das restantes amostras. CSP9 é a única sequência Angolana classificada como HAdV-5.

Relativamente às sequências classificadas como genótipos da espécie D, duas agruparam-se com as sequências de referência do genótipo HAdV-26. Estas amostras foram colhidas em unidades de saúde distintas, contudo estão estreitamente relacionadas entre si. A sequência B39 agrupa-se com as sequências HAdV-27 e a sequência HMC11 forma um subgrupo, suportado por um valor de *bootstrap* de 100%, com as sequências nucleotídicas de referência para o HAdV-9. A sequência CSP11 tem uma similaridade de 100% com as referências HAdV-15 e HAdV-29, as quais não formam ramos separados nesta região analisada.



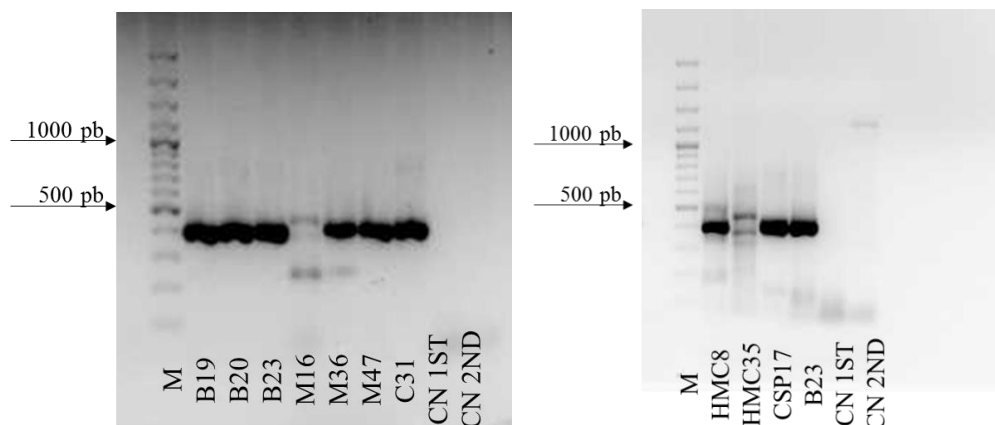
**Figura 3.5** Árvore filogenética baseada numa região do gene do hexão de adenovírus (*loop* 1, 904 nt), que ilustra as relações filogenéticas entre as estirpes presentes nas amostras de Angola (2012/2013), e as sequências de referência presentes nas bases de dados. De acordo com as sequências de referência de Li *et al.* no genótipo HAdV-41 estão representados dois GTC (*Genome Type Clusters*) (159). A árvore filogenética foi construída pelo método de *Neighbor-Joining* a partir de distâncias estimadas pelo método de Kimura a dois parâmetros. A robustez da inferência filogenética foi testada por *bootstrapping* de 1000 replicados, sendo apresentados apenas os valores  $\geq 75\%$ .



**Figura 3.6** Representação gráfica da taxa de detecção (%) dos tipos de adenovírus determinados em crianças <5 anos, em Angola (2012/2013).

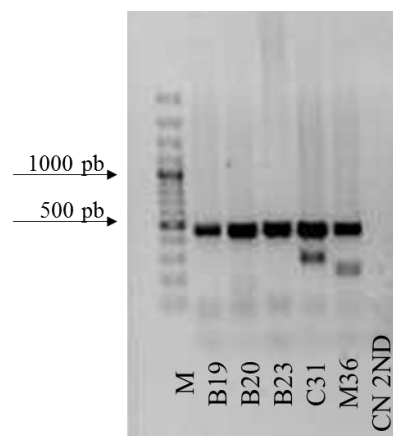
### 3.5 Astrovírus: diversidade de genótipos circulantes e potenciais vírus recombinantes

Para as amostras que nos ensaios de ELISA foram consideradas positivas para astrovírus procedeu-se à detecção do genoma viral por RT-PCR tendo como alvo de amplificação uma sequência parcial ( $\approx 420$  nt) do gene de RdRp (ORF1b). Das 11 amostras positivas por ELISA, foi possível obter produtos de amplificação com o tamanho esperado para oito (Figura 3.7). M16 e HMC35 apresentaram um padrão eletroforético diferente das restantes amostras. A alteração das condições de amplificação, tais como variação da temperatura de emparelhamento dos *primers*, não resultou na amplificação de uma banda específica com o tamanho pretendido. Tal poderá dever-se a degradação do RNA viral da amostra ou à inadequação dos *primers* usados.



**Figura 3.7** Produtos de amplificação por RT-PCR de uma sequência parcial do gene de RdRp (ORF1b) de astrovírus; M = Marcador de tamanho molecular *GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder*, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, EUA; CN1st = Controlo Negativo com produto de reação proveniente da 1ª reação; CN2nd = Controlo Negativo da 2ª reação.

Para além da região ORF1b, também se amplificou a região 5' da ORF2 codificadora da proteína da cápside VP1 dos astrovírus Angolanos, uma vez que esta região apresenta maior variabilidade genética, sendo consequentemente mais adequada à genotipagem destes vírus. Na segunda reação de amplificação de *hemi-nested* PCR obtiveram-se produtos com mobilidade eletroforética compatível com o tamanho esperado de  $\approx 450$ pb apenas para 7 amostras (Fig. 3.8). As amostras M16 e HMC35, cujo tamanho do produto de amplificação da ORF1b não era compatível com a presença de astrovírus, e HMC8 não deram origem a um produto de amplificação específico para a ORF2.

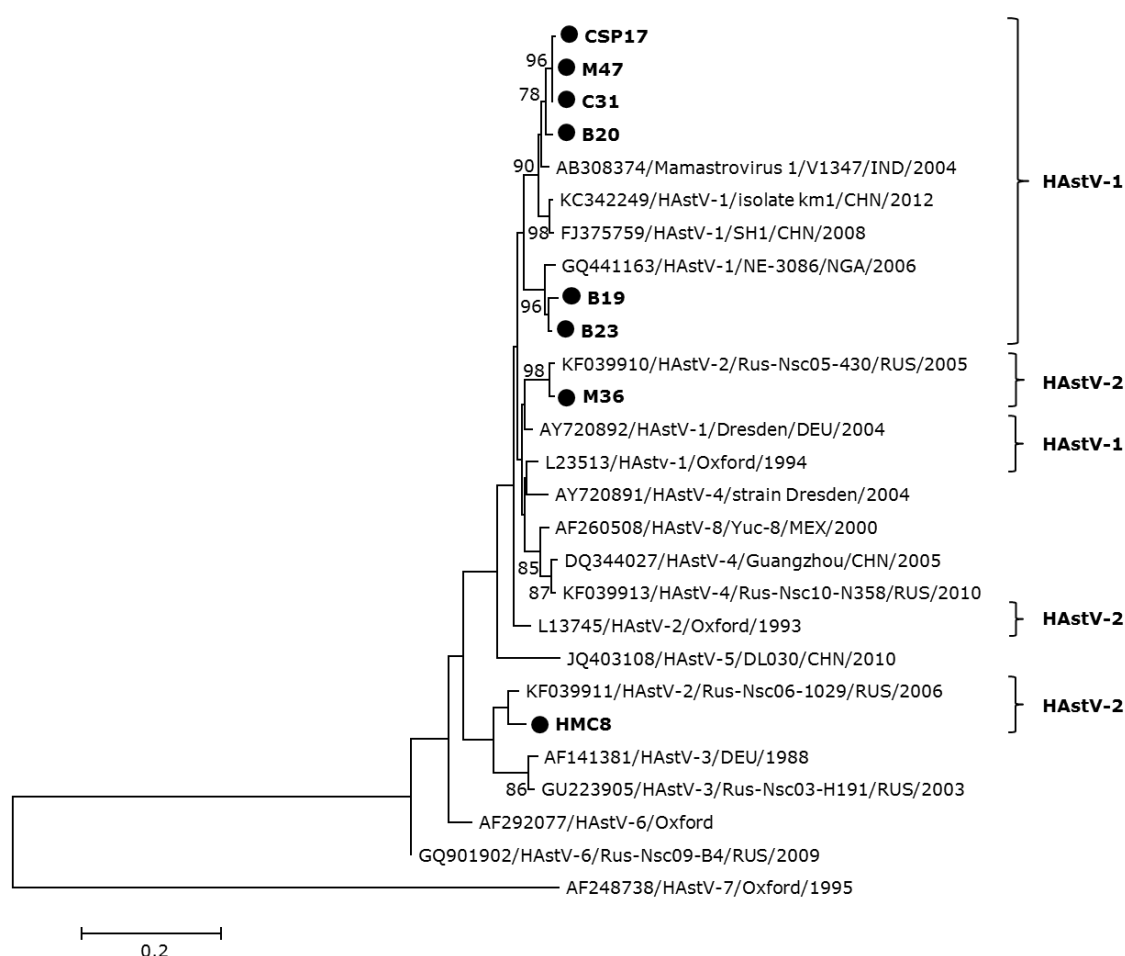


**Figura 3.8** Perfil eletroforético dos produtos amplificados por *hemi-nested*-PCR tendo como alvo a região 5' da ORF2 (450 nt) de astrovírus; M = Marcador de tamanho molecular *GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder Thermo Fisher Scientific Inc.*, Massachusetts, EUA; CN2nd = Controlo Negativo da 2ª reação.

Os produtos de RT-PCR para os genes codificadores da ORF1b (n=8) e da ORF2 (n=7) foram sequenciados com os *primers* panAV-R1 e Mon69, respetivamente. Após edição, as sequências nucleotídicas obtidas foram sujeitas a uma pesquisa de homologia com sequências disponíveis na base de dados NCBI, usando a ferramenta *Nucleotide BLAST*, cujos resultados estão apresentados no Anexo 6.8. As sequências em estudo apresentaram uma identidade  $\geq 94\%$  com as sequências de referência, sendo possível identificar, provisoriamente, 2 genótipos de astrovírus diferentes para a região da ORF1b, HAsV-1 e HAsV-2.

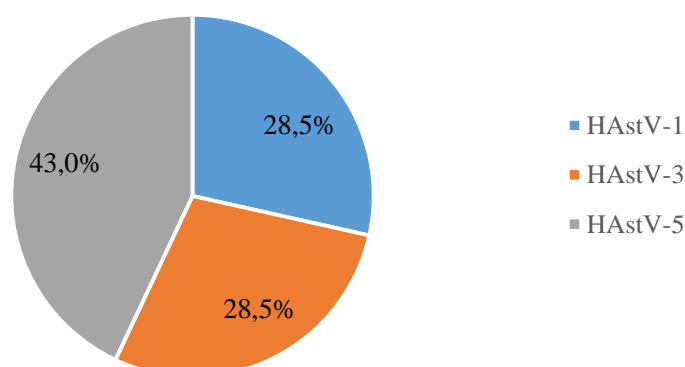
De modo a confirmar os genótipos obtidos por BLAST, procedeu-se à construção de uma árvore filogenética com as sequências das amostras Angolanas e as sequências de referência (Fig.3.9). Globalmente, esta árvore revela um baixo grau de inferência filogenética, não havendo genericamente uma separação distinta de agrupamentos de sequências correspondentes a diferentes genótipos suportados por valores de *bootstrap*  $\geq 75\%$ . As amostras M36 e HMC8 surgem agrupadas com sequências de referência para o HAsV-2. No entanto, estas duas sequências surgem em posições bem distintas da árvore (Fig. 3.9). HMC8 e a sequência de referência com a qual apresenta maior similaridade (KF039910/HAsV-2/Rus-Nsc05-430/RUS/2005) formam um agrupamento com HAsV-3, ainda que suportado por um valor de *bootstrap* inferior a 75%. De facto as duas sequências com maior similaridade com HMC8 por BLAST

(FJ842147 e KF039911) são recombinantes em que a ORF1b surge classificada como HAstV-3 (84) (85). As restantes 6 sequências de astrovírus surgem em dois agrupamentos separados dentro de um conjunto de estirpes classificadas como HAstV-1. Assim, CSP17, M47, C31 e B20 apresentaram uma similaridade entre 97,3 e 98,3% com uma sequência Indiana (AB308374/Mamastrovirus 1/V1347/IND/2004), e as sequências B19 e B23 uma similaridade  $\geq 97\%$  com uma sequência Nepalesa (GQ441163/HAstV-1/NE-3086/NGA/2006).



**Figura 3.9** Análise filogenética das sequências nucleotídicas da região 3' ORF1b de astrovírus (403 nt) presentes nas amostras de Angola (2012/2013), e das sequências de referência presentes nas bases de dados. A árvore filogenética foi construída pelo método de *Neighbor-Joining* a partir de distâncias estimadas pelo método de Kimura a dois parâmetros. A robustez da inferência filogenética foi testada por *bootstrapping* de 1000 replicados, sendo apresentados apenas os valores  $\geq 75\%$ .

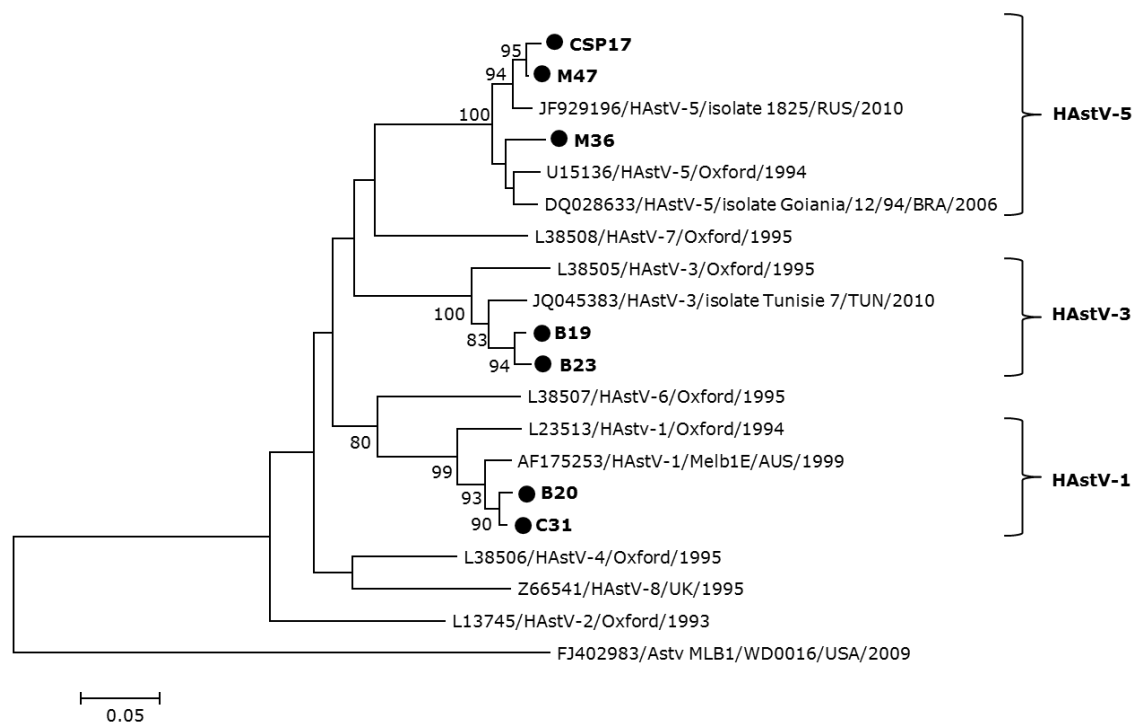
A pesquisa BLAST para as 7 sequências da ORF2 Angolanas revelaram identidade  $\geq 95\%$  com as sequências de referência (Anexo 6.8). Através deste algoritmo, nestas amostras foram identificados provisoriamente 3 genótipos de astrovírus, HAsV-1, -3 e -5. Para confirmar estes resultados de genotipagem e estabelecer relações filogenéticas entre os astrovírus Angolanas e destes com outros astrovírus com sequências depositadas na base de dados NCBI, construiu-se a árvore filogenética mostrada na Fig. 3.11. Contrariamente ao observado para a ORF1b, a árvore filogenética da ORF2 apresenta um elevado grau de inferência filogenética estando os agrupamentos de sequências correspondentes aos diferentes genótipos suportados por valores de *bootstrap*  $\geq 99\%$ . As sequências da ORF2 de astrovírus Angolanas distribuem-se por três genótipos, HAsV-1, -3 e -5, tendo confirmado os genótipos atribuídos com base na pesquisa BLAST. A Fig. 3.10 representa a prevalência dos diferentes genótipos da ORF2 dos astrovírus detetados em amostras Angolanas.



**Figura 3.10** Representação gráfica da taxa de detecção (%) dos genótipos de astrovírus (ORF2) determinados em crianças <5 anos, em Angola (2012/2013).

As sequências B20 e C31 formam um agrupamento com as sequências nucleotídicas de referência para o genótipo 1 dos astrovírus. Ambas as sequências apresentam 97% de similaridade com a sequência de astrovírus Australiana (AF175253/HAsV-1/Melb1E/AUS/1999), formando uma linhagem distinta da referência da estirpe *Oxford*. Situação semelhante surge no *cluster* de HAsV-3, onde as

sequências das amostras B19 e B23 apresentam um grau de semelhança  $\geq 95\%$  com a sequência do isolado *Tunisie* e formando um grupo monofilético separado da estirpe *Oxford* para este genótipo.



**Figura 3.11** Árvore filogenética baseada na região 5' da ORF2 de astrovírus (448nt), que ilustra as relações filogenéticas entre as sequências nucleotídicas de astrovírus presentes nas amostras de Angola (2012/2013), e as sequências de referência presentes nas bases de dados. A sequência correspondente da estirpe FJ402983 de AstV-MLB1 foi usada como *outgroup*. A árvore filogenética foi construída pelo método de *Neighbor-Joining* a partir de distâncias estimadas pelo método de Kimura a dois parâmetros. A robustez da inferência filogenética foi testada por *bootstrapping* de 1000 replicados, sendo apresentados apenas os valores  $\geq 75\%$ .

Também no *cluster* de HAstV-5, parece existir duas linhagens. As amostras CSP17 e M47 apresentam um grau de similaridade de 97% e 98% com o isolado identificado na Rússia em 2010 (JF929196/HAstV-5/isolate 1825/RUS/2010). A sequência da amostra M36 surge separadamente noutro agrupamento, sendo 96% idêntica à sequência da estirpe *Oxford* (U15136/HAstV-5/Oxford/1994).

Quando comparamos a distribuição das sequências de astrovírus Angolanas nas duas árvores filogenéticas construídas, observamos uma topologia distinta, não só na



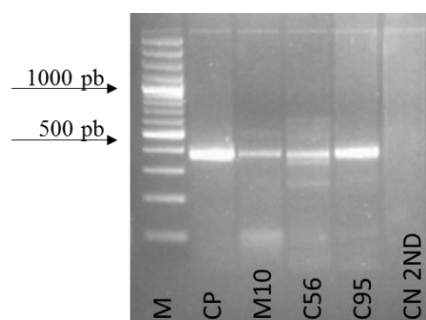
forma como se agrupam entre si como no agrupamento com sequências de referência dos diferentes genótipos para as duas regiões analisadas. Na árvore da ORF1b (Fig. 3.11), CSP17, M47, C31 e B20 estão estreitamente relacionadas entre si, formando um grupo dentro do conjunto de sequências de referência consideradas HAstV-1, enquanto na árvore da ORF2, CSP17 e M47, embora mantendo-se associadas, surgem no agrupamento de HAstV-5 (Fig. 3.12), sugerindo tratarem-se de vírus recombinantes. Por outro lado, B20 e C31 continuam a surgir estreitamente relacionadas e dentro dos HAstV-1. Relativamente às sequências B19 e B23, mantêm-se associadas nas duas árvores mas surgem em agrupamentos de genótipos diferentes, HAstV-1 para a ORF1b e HAstV-3 para a ORF2. Esta diferença de padrão de distribuição filogenética sugere novamente que estamos perante vírus potencialmente recombinantes. Identicamente, a sequência M36 classificada como HAstV-2 para a ORF1b, surge classificada como HAstV-5 para a ORF2. No entanto, na árvore da ORF1b as sequências de HAstV-2 estão dispersas sem qualquer tipo de agrupamento mesmo que suportado por um valor de *bootstrap* baixo. Porém, deve-se salientar que nas duas árvores o posicionamento desta sequência é muito distinto relativamente às outras sequências Angolanas. Resumindo, a análise filogenética efetuada sugere putativas formas recombinantes entre HAstV-1 e HAstV-5 para os vírus CSP17 e M47, entre HAstV-1 e HAstV-3 para B19 e B23 e ainda entre HAstV-2 e HAstV-5 para M36.

### 3.6 Genótipos dos norovírus circulantes

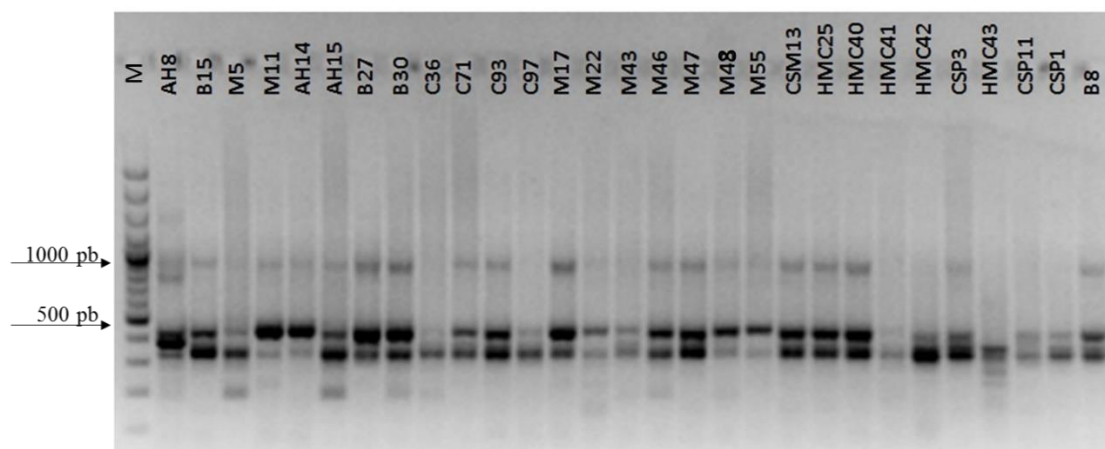
Para a determinação dos genótipos de norovírus nas amostras estudadas, procedeu-se à amplificação da região NS do genoma viral, tendo como matriz cDNA com origem em 37 amostras onde este vírus foi detetado por RT-PCR em tempo real. Na Fig. 3.12 está apresentado um padrão de migração típico para os produtos de amplificação dos norovírus GI. A banda com o tamanho esperado (cerca de 380 pb) foi observada para todas as amostras. Igualmente, as 30 amostras positivas por RT-PCR em tempo real para norovírus GII, amplificaram por *nested*-PCR uma banda com o tamanho esperado

## Resultados

de cerca de 345 pb (Fig. 3.13). No entanto, para além desta banda, observaram-se bandas adicionais, geralmente de maiores dimensões, podendo ser resultado da utilização de *primers* degenerados e de temperaturas de hibridação baixas. No entanto, a banda forte com cerca de 400 pb que surge na maioria das amostras poderá corresponder ao produto da primeira reação de PCR, uma vez que a sua presença não dificultou, de um modo geral, a sequenciação direta destes produtos. Algumas sequências foram clonadas para se obter cromatogramas de boa qualidade. A amostra C95 de norovírus GI foi a única para a qual não se conseguiu obter uma sequência, apesar da amplificação numa quantidade abundante.



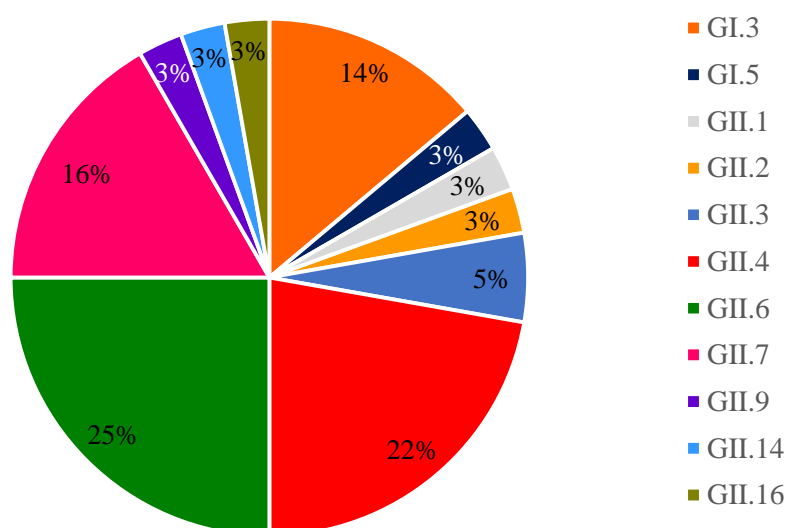
**Figura 3.12** Padrão eletroforético de produtos amplificados por PCR para a região NS de norovírus GI; M = Marcador de tamanho molecular GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, EUA; CP = Controlo Positivo; CN2nd = Controlo Negativo da 2ª reação.



**Figura 3.13** Padrão electroforético dos produtos de PCR para amplificação da região NS de norovírus GII; M = Marcador de tamanho molecular GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, EUA.

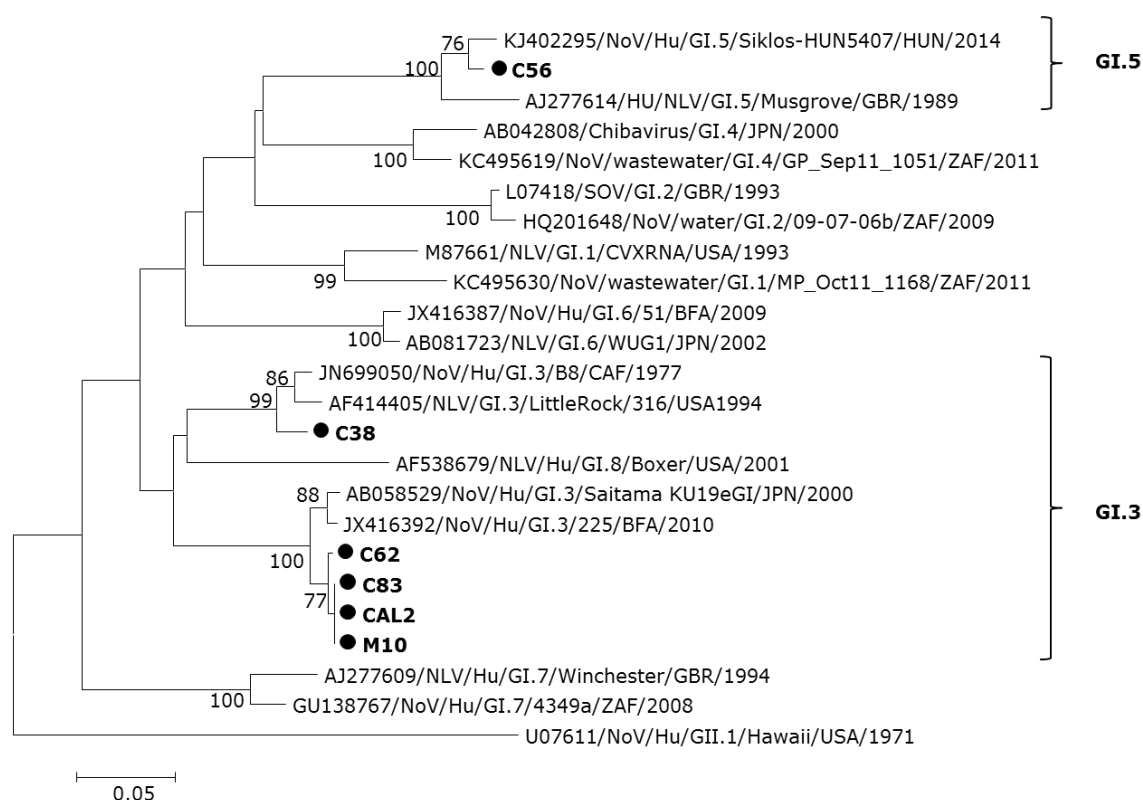
As sequências nucleotídicas obtidas a partir dos fragmentos da região NS da ORF2 foram comparadas com sequências presentes na base de dados NCBI, usando as ferramentas *Nucleotide BLAST* e RIVM. Os genótipos obtidos através destes dois tipos de análise encontram-se no Anexo 6.9. As sequências das amostras Angolanas apresentaram uma identidade  $\geq 93\%$  com as sequências de referência, sendo os genótipos identificados concordantes nas duas análises. De modo a confirmar os resultados e avaliar as relações filogenéticas das sequências analisadas entre si e com sequências das bases de dados, foram construídas duas árvores filogenéticas, uma para cada genogruppo.

As árvores relativas aos norovírus GI e GII estão apresentadas nas Fig. 3.15 e 3.16, respetivamente. Ambas as árvores apresentam um elevado grau de inferência filogenética, estando os agrupamentos correspondentes aos diferentes genótipos maioritariamente suportados por valores de *bootstrap*  $\geq 98\%$  tendo-se confirmado os genótipos previamente atribuídos. Na Fig. 3.14 está representada a prevalência dos diferentes genótipos de norovírus identificados.



**Figura 3.14** Representação gráfica da taxa de detecção (%) dos genótipos de norovírus determinados em crianças <5 anos, em Angola (2012/2013).

Relativamente aos norovírus GI, das 6 sequências analisadas, cinco agrupam-se com sequências de referência do genótipo 3 com valores de *bootstrap*  $\geq 99\%$ , e uma com sequências do genótipo 5 (Fig. 3.15). Esta, C56, apresenta 94% de similaridade com uma sequência com origem na Hungria (KJ402295/NoV/Hu/GI.5/Siklos-HUN5407/HUN/2014). As sequências GI.3 distribuem-se segundo dois agrupamentos distintos bem suportados (*bootstrap*  $\geq 99\%$ ). A maioria das sequências Angolanas (C62, C83, CAL2 e M10) forma um ramo monofilético dentro da respetiva linhagem, separadas das outras sequências de referência, ainda que apresentem similaridade  $\geq 97,1\%$  com a sequência nucleotídica de Burquina Faso (JX416392/NoV/Hu/GI.3/225/BFA/2010). A amostra C38, situada no outro agrupamento GI.3 tem 97,1% de similaridade com a sequência de uma amostra da República Centro-Africana (JN699050/NoV/Hu/GI.3/B8/CAF/1977).



**Figura 3.15** Árvore filogenética baseada na região NS da ORF2 de norovírus GI (377 nt) que representa as relações filogenéticas entre as sequências nucleotídicas das amostras de Angola (2012/2013), e as sequências de referência presentes nas bases de dados. A sequência correspondente da estirpe U07611 de norovírus humano GII.1 foi utilizada como *outgroup*. Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbor-Joining* a partir de distâncias estimadas pelo método de Kimura a dois parâmetros. A robustez da inferência filogenética foi testada por *bootstrapping* de 1000 replicados, sendo apresentados apenas os valores  $\geq 75\%$ .

Quanto ao genogrupo II, as sequências de norovírus apresentaram grande diversidade de genótipos distribuindo-se por agrupamentos de nove genótipos diferentes. As sequências GII.6 são as mais abundantes (n=9, 30%), seguindo-se GII.4 (n=8, 26,7%), GII.7 (n=6, 20%), GII.3 (n=2, 6,7%) e GII.1, 2, 9, 14 e 16, cada um representado por uma sequência (3%). As estirpes GII.6 Angolanas encontram-se distribuídas por três agrupamentos diferentes (Fig. 3.16). A maioria das amostras (AH8, C93, B30, M46 e M22) forma um grupo monofilético distinto e apresentam maior similaridade com uma sequência de referência do Burquina Faso (KF434305/NoV/Hu/GII.6/T209/BFA/2011).

As sequências HMC41 e HMC42 estão estreitamente relacionadas entre si e com uma sequência do Uruguai (KJ577799/NoV/Hu/GII.6/70/URY/2011). As sequências M11 e M55 formam um ramo monofilético com uma sequência nucleotídica da África do Sul (KC495684/NoV/wastewater/GII.6/NW\_Nov11\_1266\_2/ZAF/2011) e outra do Brasil (JX898890/NoV/Hu/GII.6/SapeQ151/BRA/2009) com similaridades  $\geq 99\%$ .

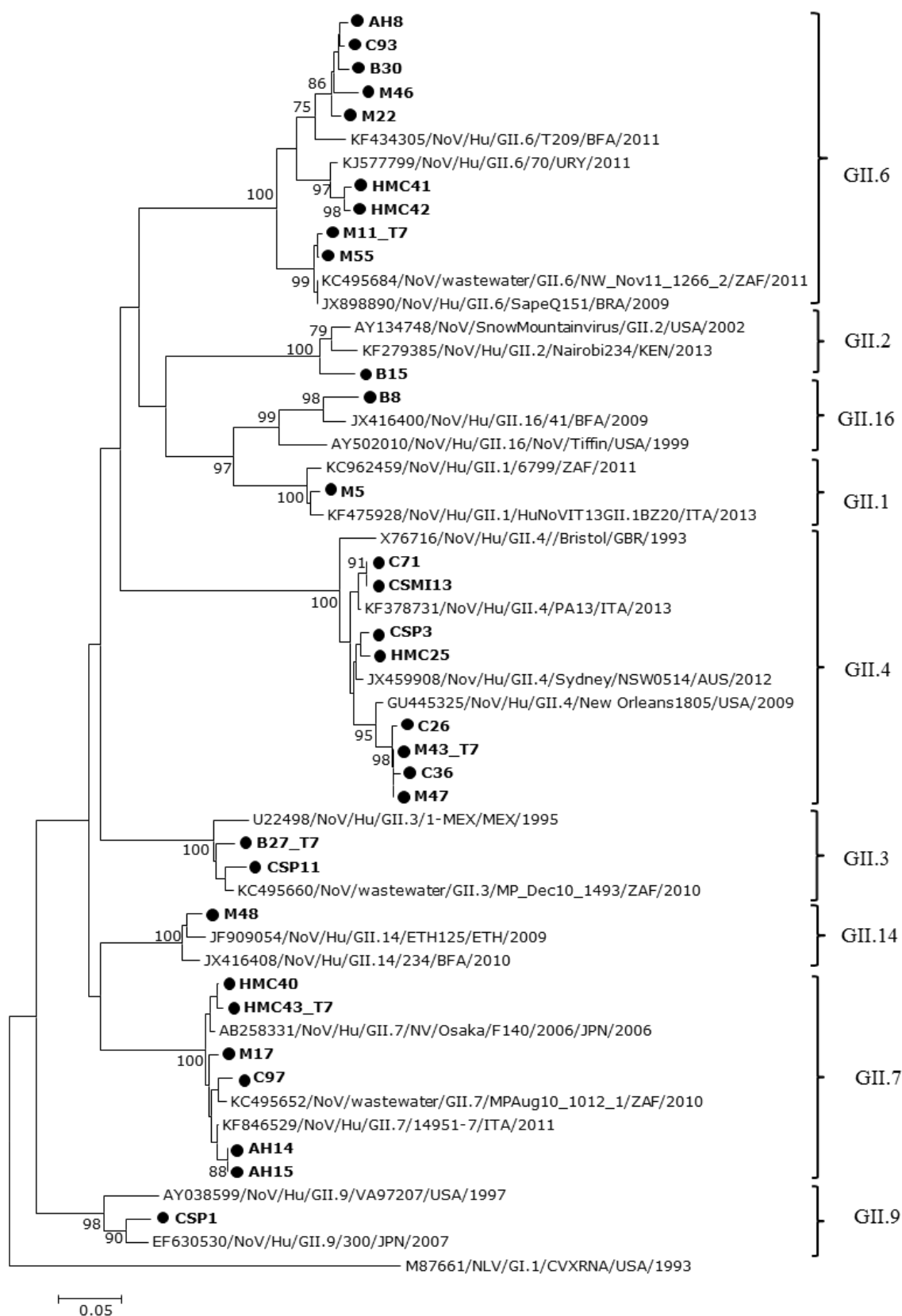
No que concerne às sequências de norovírus GII.4 angolanas, quatro (C26, M43\_T7, C36 e M47) formam um agrupamento distinto, com uma baixa diversidade genética indicada pelo reduzido tamanho dos ramos, que se agrupa com a estirpe *NewOrleans* 2009 (GU445325/NoV/Hu/GII.4/New Orleans1805/USA/2009), apresentando uma similaridade  $\geq 97,8\%$  com esta estirpe de referência. As sequências CSP3 e HMC25 formam aparentemente um subgrupo com a sequência australiana (JX459908/Nov/Hu/GII.4/Sydney/NSW0514/AUS/2012) suportado por um valor baixo de *bootstrap* (21%), sugerindo uma origem distinta para estes vírus. As amostras C71 e CSMI13 estão estreitamente relacionadas entre si, e agrupam com a sequência italiana (KF378731/NoV/Hu/GII.4/PA13/ITA/2013), sendo este grupo suportado por um valor de *bootstrap* de 63%.

As estirpes Angolanas GII.7 apresentam um padrão disperso dentro do agrupamento, sem valores de *bootstrap* significativos a associarem as diferentes sequências (Fig. 3.16). HMC40 e HMC43 apresentaram uma maior similaridade ( $\geq 98,7\%$ ) com a sequência da estirpe *Osaka/F140* 2006, enquanto as amostras AH14 e AH15 são 99,1% similares à sequência de uma amostra italiana (KF846529/NoV/Hu/GII.7/14951-7/ITA/2011). Pela análise de distâncias, a sequência

da amostra C97 mostrou ser 98,3% idêntica a uma sequência nucleotídica da África do Sul (KC495652/NoV/wastewater/GII.7/MPAug10\_1012\_1/ZAF/2010). As amostras AH14 e AH15, estreitamente relacionadas entre si, agruparam-se com a sequência nucleotídica italiana (KF846529/NoV/Hu/GII.7/14951-7/ITA/2011), mas o agrupamento está suportado por um valor de 50% de *bootstrap*.

No grupo genético GII.3, suportado por um valor de 100% de *bootstrap*, estão incluídas as amostras B27\_T7 e CSP11 (Fig. 3.16). Ambas as amostras apresentam uma similaridade  $\geq 97,4\%$  em relação a uma sequência da África do Sul (KC495652/NoV/wastewater/GII.7/MPAug10\_1012\_1/ZAF/2010).

Curiosamente, os genótipos que incluem maior número de estirpes, *i.e.* GII.6, GII.4 e GII.7, têm proveniência diversa. Por outro lado, os diferentes centros de saúde apresentam também grande diversidade de genótipos não havendo surtos com uma única origem.



**Figura 3.16** Árvore filogenética com base na região NS da ORF2 de norovírus GII (345 nt), que ilustra as relações filogenéticas entre as sequências nucleotídicas de norovírus presentes nas

amostras de Angola (2012/2013), e as sequências de referência presentes nas bases de dados. A sequência correspondente da estirpe M87661 de norovírus humano GI.1 foi utilizada como *outgroup*. Árvore filogenética construída pelo método de *Neighbor-Joining* a partir de distâncias estimadas pelo método de Kimura a dois parâmetros. A robustez da inferência filogenética foi testada por *bootstrapping* de 1000 replicados, sendo apresentados apenas os valores  $\geq 75\%$ .

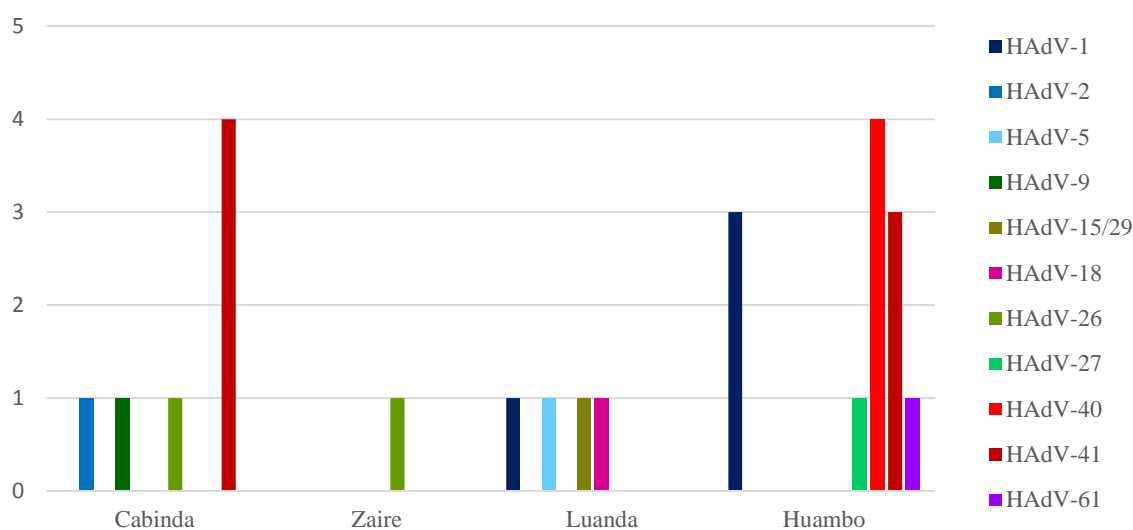
### 3.7 Epidemiologia da infecção pelos diferentes genótipos de adenovírus, astrovírus e norovírus

Determinados os genótipos de adenovírus, astrovírus e norovírus, procedeu-se a um cruzamento de dados dos mesmos com as informações clínicas e demográficas

A nível de distribuição geográfica dos diferentes genótipos, foi na região do Huambo onde se verificou uma maior diversidade de adenovírus (Fig. 3.17). Os adenovírus da espécie F, designados como entéricos, foram detetados apenas nas províncias de Cabinda e de Huambo. O genótipo mais abundante, HAdV-41 foi identificado em amostras de cabinda e do Huambo, sendo os vírus do subgrupo GTC-2 unicamente detetados em Cabinda. Menos frequentes, os HAdV-40 foram apenas detetados no Huambo. Na província do Zaire foi detetada apenas uma amostra positiva para adenovírus, correspondendo a HAdV-26 (Figura 3.17).

As crianças infetadas por HAdV da espécie F, não apresentavam febre, tinham, em média, 3,71 episódios de diarreia ao longo de 2,71 ( $\pm 0,76$ ) dias. As infetadas por outras espécies de adenovírus apresentaram, em média, diarreias mais prolongadas ( $3,43 \pm 1,13$  dias). As crianças infetadas com HAdV40 e HAdV41 apresentavam mais episódios diários de vômitos, e durante mais dias, em comparação com as crianças infetadas com outros adenovírus, mas sem significado estatístico ( $p= 0,492$  e  $p=0,440$ ). Quando comparado o grau de gravidade da diarreia entre estes dois grupos, as crianças infetadas com HAdV espécie F, apresentaram um grau mais elevado ( $7,43 \pm 3,10$ , vs  $4,50 \pm 2,51$ ), e com uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0,048$ ) (Anexo 6.10).

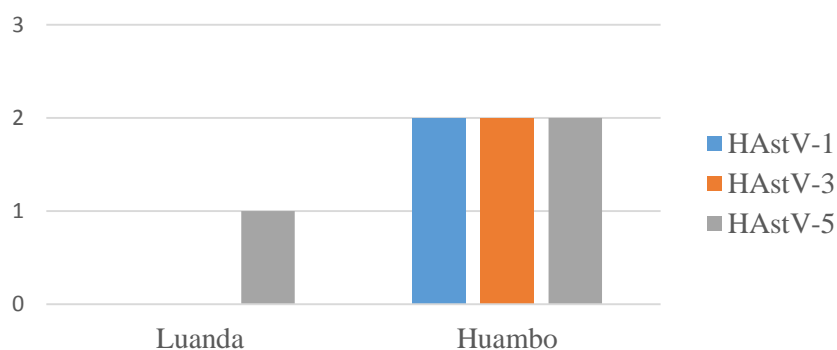




**Figura 3.17** Representação gráfica da distribuição geográfica dos diferentes tipos de adenovírus em crianças <5 anos, em Angola (2012/2013).

No que respeita à distribuição geográfica dos genótipos de astrovírus (ORF2), no Huambo observou-se uma distribuição equitativa dos 3 genótipos identificados (Fig. 3.19). Na região de Luanda foi identificada uma amostra com HAdV-5. Não foram detetados astrovírus na província do Zaire e em Cabinda foi identificada uma estirpe do genótipo 3 para a ORF1b.

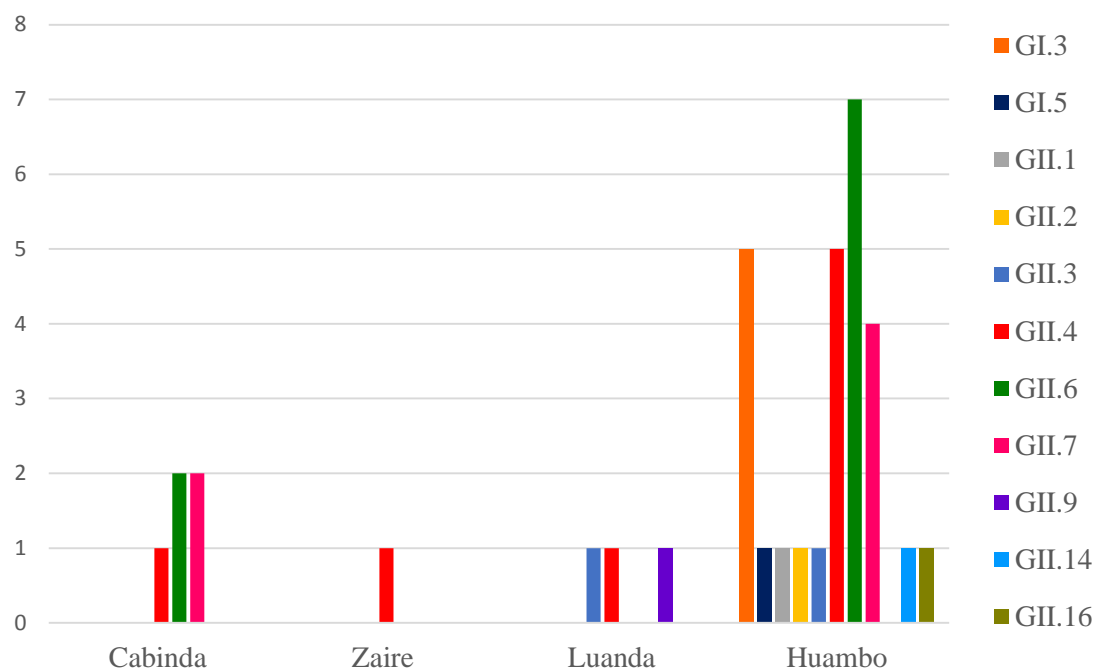
Quanto a uma análise da associação entre características demográficas e clínicas com os diferentes genótipos individuais de astrovírus, esta não foi possível efetuar devido ao número reduzido de amostras detetadas e genotipadas (Fig. 3.18).



**Figura 3.18** Representação gráfica da distribuição geográfica dos diferentes tipos de astrovírus (para a região genómica ORF2) em crianças <5 anos, em Angola (2012/2013).

## Resultados

Relativamente à distribuição geográfica da infeção por norovírus (Fig. 3.19), observou-se uma maior diversidade de genótipos circulantes na região do Huambo, sendo esta a única região onde foram detetados norovírus GI. As estirpes GII.4 foram identificadas em todas as regiões estudadas, sendo as únicas detetadas no Zaire.



**Figura 3.19** Representação gráfica da distribuição geográfica dos diferentes tipos de norovírus (para a região NS da ORF2) em crianças <5 anos, em Angola (2012/2013).

Em relação às características clínicas das crianças infetadas com norovírus, nenhuma das crianças inquiridas infetadas com o vírus tinha uma temperatura  $\geq 37,6^{\circ}\text{C}$ . Entre as crianças infetadas com NoV GII.4 ou NoV não-GII.4, não se observou diferença relativamente ao número de episódios de diarreia ou duração da mesma, bem como para o número de episódios de vômitos e a duração (em dias) dos mesmos. A frequência de crianças desidratadas, e o nível de atividade das mesmas, foi idêntica entre crianças infetadas com NoV GII.4 ou NoV não-GII.4. Quanto ao grau de gravidade da diarreia, este foi semelhante entre os dois grupos de crianças infetadas (Anexo 6.10).

#### **4. DISCUSSÃO e CONCLUSÕES**

Dados de 2010 revelam que em Angola, a diarreia é a causa de 15% das mortes em crianças com idade inferior a 5 anos de idade (11). Estima-se que os rotavírus sejam responsáveis por um terço das mortes devido à diarreia, sendo as restantes devidas a outros vírus entéricos, bactérias, parasitas, helmintas e protozoários (1) (148). Neste estudo pretendemos documentar a epidemiologia das infeções entéricas pediátricas em varias regiões deste país e a diversidade genética de adenovírus, astrovírus e norovírus, considerados, depois dos rotavírus, os principais agentes etiológicos virais de diarreia.

Deste estudo fizeram parte 222 amostras de fezes de crianças com idade inferior a cinco anos e com GEA que recorreram a diversas unidades de saúde nas províncias de Cabinda, Luanda, Huambo e Zaire, em Angola em 2012 e 2013. Cerca de um terço das crianças (29,7%) estavam infetadas com um ou dois dos vírus estudados. No conjunto das amostras analisadas com inquéritos disponíveis (n=108) observou-se que 85,3% das crianças infetadas tinha uma idade menor ou igual a 24 meses, confirmando-se assim a elevada prevalência de adenovírus, astrovírus e norovírus nos casos de GEA, durante os dois primeiros anos de vida, descrita na literatura (18) (43) (78).

A amamentação tem um papel importante na proteção contra a diarreia nas crianças de 0-24 meses de idade, sendo superior nas que ingerem exclusivamente leite materno (160). Esta proteção conduz a uma diminuição da incidência e da duração da diarreia. Pela análise dos inquéritos verificou-se que a maioria das crianças infetadas estava a ser amamentada (67,6%). Porém, a amamentação não era exclusiva, uma vez que 92,3% das crianças ingeria outros alimentos. Ao comparar as crianças alimentadas com leite materno e outros alimentos, com as crianças exclusivamente amamentadas, a média da duração (em dias) da diarreia é semelhante (3,95 vs. 3,38,  $p = 0,548$ ). Contudo, a nível de episódios diários de diarreia, a média é de 3,74 e 2,75 episódios ( $p = 0,059$ ). Apesar da associação não ser estatisticamente significativa, as crianças exclusivamente amamentadas tiveram menos episódios de diarreia.

Outros sintomas de GEA como a febre, vômitos e o estado de desidratação e de malnutrição foram também avaliados na população pediátrica estudada, tendo-se

constatado que as percentagens de crianças infetadas com estas características de GEA foram inferiores às percentagens descritas em estudos anteriores (20) (22). Segundo a escala de Nakagomi, os episódios de diarreia com classificação maior ou igual a 12, numa escala de 0-20, são categorizados como severos (153). No grupo de crianças infetadas, o grau de gravidade dos episódios de diarreia foi de  $6,03 \pm 2,9$ . A escala de Nakagomi foi a selecionada para esta classificação, pois os inquéritos englobavam todos os critérios desta escala (Anexo 6.2 e 6.3). Porém, o valor obtido para o grau de gravidade da diarreia poderá ser uma subestimativa uma vez que alguns dos inquéritos não estavam totalmente preenchidos, sendo o parâmetro cotado com zero na ausência de informação.

No total, 29,7% (66/222) das crianças estavam infetadas com pelo menos um dos vírus. A taxa de deteção foi de 11% (24/222) para os adenovírus, 5% (11/222) para os astrovírus e 17% (37/222) para os norovírus. As taxas relativas obtidas estão de acordo com estudos anteriores, na medida em que a taxa de deteção dos norovírus é superior à dos adenovírus, que por sua vez é superior à dos astrovírus (20) (56) (161). Das 66 crianças infetadas, 6 apresentavam infeção mista. Neste estudo verificou-se que não existe correlação entre a gravidade dos episódios de diarreia e o facto de serem infeções por um único agente etiológico ou infeções mistas ( $5,97 \pm 2,93$  vs.  $6,40 \pm 3,05$ ,  $p = 0,763$ ), situação também encontrada num estudo realizado no Gana (22).

Na literatura, a taxa de deteção de adenovírus em populações pediátricas com GEA é muito variável, podendo oscilar entre, por exemplo, cerca de 37% no Quênia e Ruanda (17) (162); e 2% no Bangladesh e China (21) (163). A prevalência de 11% estimada para esta população Angolana é semelhante à encontrada na África do Sul (9,8%), no Egipto (10,4%) e nos EUA (11,8%) (164) (161) (20). Porém, poderá ser uma subestimativa uma vez que usámos dois métodos de rastreio, um teste rápido imunoenzimático (*CerTest Rotavirus-Adenovirus*) que nos permitiu detetar 12 amostras com antígenos de adenovírus num total de 199 e *nested*-PCR com *primers* universais que revelou a presença de DNA de adenovírus em 11 de 24 amostras fecais, sugerindo diferenças de sensibilidade para os dois ensaios, à semelhança do que foi descrito por outros autores (165) (44). Ainda, dentro dos testes imunoenzimáticos, a sensibilidade pode variar de acordo com a gama de serotipos alvo, sendo mais baixa para os dirigidos

apenas contra HAdV-40/41 (17). O fabricante do teste rápido usado (*CerTest Biotec*, Espanha) não descreve a gama de serotipos detetados. No entanto, quando analisamos os genótipos detetados por ambos os métodos não encontramos diferenças estatisticamente significativas, o que é sugestivo de se tratar de um teste que deteta, de uma forma genérica, adenovírus humanos e não especificamente HAdV-40/41. Para além das diferenças na sensibilidade dos testes, outros parâmetros poderão ser responsáveis pelas grandes divergências nos valores de prevalência, designadamente a seropositividade para VIH dos indivíduos envolvidos (17).

Neste estudo, a maioria das crianças infetadas com adenovírus tinha idade igual ou inferior a 24 meses (94,1%), resultado concordante com estudos anteriores realizados em diversos continentes (43) (44) (56) (161). A infeção por adenovírus foi mais frequente nas crianças do sexo feminino do que nas do sexo masculino, com uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0.006$ ). Contrariamente, outros estudos demonstraram uma infeção predominante entre crianças do sexo masculino (23) (57). Contudo, é difícil de encontrar uma justificação para estes resultados, nomeadamente quando na literatura a maioria dos dados apontam para a ausência de associação entre género e infeção. A percentagem de crianças infetadas com febre, desidratadas, malnutridas ou com a atividade reduzida foi inferior à detetada em estudos anteriores (21) (23) (166), assim como a média do grau de gravidade da diarreia (20). A percentagem de crianças com vómitos foi semelhante a valores anteriormente relatados (21) (23). Os casos positivos de adenovírus tiveram maior incidência na época das chuvas ( $p = 0.005$ ), como reportado também por Moyo *et al.* (2014) (166). No entanto, a maioria dos estudos não mostra um padrão de sazonalidade específico para a infeção por adenovírus (19) (55). Uma avaliação contínua da infeção durante um período mais longo, *e.g.* mensal ao longo de 2 anos, será necessária para concluir sobre a sazonalidade da infeção por adenovírus nestas regiões de Angola.

A caracterização molecular de sequências nucleotídicas abrangendo a ansa L1 do hexão permitiu identificar a circulação de HAdVs de onze tipos diferentes pertencentes a quatro espécies, A, C, D e F. A espécie F (HAdV-40 e -41), classicamente considerada como incluindo os “adenovírus entéricos”, revelou-se predominante relativamente às outras espécies (45,8%, 11/24) como seria expectável de acordo com o

descrito na maioria de estudos similares realizados em regiões geográficas muito diversas (165) (167), (17) (20) (43) (44) (47) (168) (169). Porém, curiosamente os adenovírus entéricos foram detetados apenas nas províncias de Cabinda e de Huambo, e HAdV-40 apenas nesta última. Pela similaridade das amostras, evidenciada pelo comprimento curto dos ramos (Fig. 3.5,) deduz-se que a mesma estirpe de HAdV-40 circule na região de Mineira, Alto-Hama e Bailundo. HAdV-41 foi o tipo de adenovírus entérico mais frequentemente detetado (63,6%, 7/11). Na bibliografia constatamos que a proporção relativa de HAdV-40 e -41 varia de estudo para estudo, tanto em termos geográficos como temporais. Enquanto nas décadas de 80 e 90 do século passado eram descritas prevalências aproximadamente iguais destes dois serotipos (170) (171), a tendência na última década é para um decréscimo da circulação de HAdV-40 e concomitante aumento de HAdV-41, tornando-se este o serotipo predominante associado a GEA (167) (165) (20) (44) (159) (168). No entanto, neste período, no Gana e no Bangladesh foi descrito HAdV-40 maioritariamente ou exclusivamente (21) (172). Mais uma vez, estas diferenças podem ser devidas a sensibilidade diferencial dos testes de deteção. De facto, foram descritas limitações no uso de ELISAs comerciais para deteção de HAdV-41 (159) (173). Pela análise da árvore filogenética da Fig. 3.5, é possível verificar a inclusão dos vírus Angolanos HAdV-41 em dois *clusters* genómicos distintos, GTC-1 e GTC-2, como descrito inicialmente por Li *et al.* (2004) para vários países asiáticos (159) e posteriormente por Dey *et al.* (2011) para a Índia (44). A existência destes dois GTCs reflete a acumulação de mutações de aminoácidos nas regiões hipervariáveis do gene do hexão (44) (159). Esta deriva antigénica poderá ser responsável pelo não reconhecimento por anticorpos monoclonais usados nos testes comerciais. Curiosamente, a circulação de estirpes GTC-1 foi detetada apenas em Cabinda.

HAdV-1, -2 e -5, HAdVs da espécie C, normalmente associados a infeções do sistema respiratório (37), foram identificados num quarto das amostras fecais com adenovírus. Estes tipos foram também anteriormente detetados em casos de GEA (17) (19) (45) (169) (167). As doenças respiratórias são uma manifestação comum da infeção por HAdVs em crianças e foi demonstrado que os HAdVs que infetam as mucosas respiratórias podem ser excretados nas fezes durante meses ou anos, pelo que a sua presença nestas amostras poderá não estar diretamente associada a gastroenterite (48).

Foram identificadas 5 amostras com adenovírus pertencentes à espécie D (20,8%, 5/24). Os adenovírus desta espécie têm sido associados a uma diversidade de doenças, nomeadamente queratoconjuntivite epidémica e gastroenterite (37). São inclusivamente a espécie mais frequentemente detetada nas fezes de doentes infetados por VIH com gastroenterite (24). Um estudo realizado com amostras fecais de populações de quatro países da África subsariana demonstrou uma elevada prevalência (28%-66%) de HAdV-D, grande diversidade de tipos circulantes e coinfeção com vários tipos, sem associação a doença (174). Um outro estudo realizado no Quênia identificou os HAdVs da espécie D como os mais prevalentes (48,6%) em amostras fecais de crianças com GEA a viverem em ambiente urbano (17). Os tipos HAdV-9 e -10 da espécie D, raramente referidos na literatura, foram identificados em 60% das crianças com diarreia atribuída a adenovírus na cidade de Dhaka, Bangladesh (21). HAdV-9 foi identificado numa amostra Angolana (HMC11). Curiosamente HAdV-67, isolado a partir de uma criança com gastroenterite, é um recombinante de vários tipos da espécie D, sendo classificado como HAdV-9 na região L1 e L2 do hexão (53). Será interessante analisar outras regiões genómicas para uma melhor caracterização do vírus HMC11. A estirpe CSP11 apresentou uma similaridade de 100% com as sequências nucleotídicas de referência para HAdV-15 e HAdV-29. A incapacidade de distinguir estes dois tipos com base na análise desta região do genoma foi igualmente descrita por Madisch *et al.* (2005) que, através da análise filogenética das sequências nucleotídicas das regiões L1 e L2 dos HAdV-15 e o HAdV-29, verificaram não existir qualquer divergência entre as sequências destes dois tipos (32).

Identificámos ainda duas amostras com HAdV-A (8,3%, 2/24) classificados como HAdV-18 e HAdV-61. HAdV-18 foi igualmente identificado em crianças com GEA no Quênia (17). Curiosamente, a criança infetada com HAdV-18 foi a única criança inquirida infetada com febre. HAdV-31, o adenovírus da espécie A associado a GEA pediátrica na Índia (168) e detetado nas fezes de indivíduos infetados com VIH (175), não foi identificado nas amostras Angolanas. No entanto, identificámos uma estirpe (CAL3) classificada filogeneticamente como HAdV-61, um adenovírus recombinante entre HAdV-31 e um adenovírus próximo de HAdV-12. Este recombinante foi isolado de um doente com gastroenterite em Quioto, Japão (176). Sendo esta a única referência na base de dados do NCBI, presumimos que este vírus está aqui a ser identificado pela

segunda vez e num continente diferente, pelo que seria interessante fazer a sequenciação do restante genoma viral para uma classificação inequívoca.

A taxa de deteção dos astrovírus nas amostras fecais Angolanas foi de 5% (11/222), um valor dentro da gama descrita a nível global, uma vez que os astrovírus estão associados a 2 - 9% dos casos de GEA, não bacteriana, em crianças (70) (74). A incidência média a nível mundial é de 11% com incidências de 7% e 23% em áreas rurais e urbanas, respetivamente (70). A incidência é, geralmente, mais elevada nos países em vias de desenvolvimento (70). No entanto, paradoxalmente, em Angola e noutros países da África subsariana a prevalência é baixa: Botswana, 2,7% (55); Quênia 5,3% (177); Gana 4,8% e 3,3% (22) (172), Ruanda 4,1% (162), Zanzibar 2,4% (178). À semelhança dos adenovírus, poderemos estar perante um teste imunoenzimático com uma sensibilidade baixa e 5% ser uma subestimativa da prevalência. Eventualmente, este valor poderá aumentar se for usado no rastreio RT-PCR com *primers* universais.

A maioria das crianças infetadas por astrovírus (75%) tinha idade igual ou inferior a 24 meses, como descrito para outros estudos similares (12) (70) (75). A infeção foi mais comum nas crianças do sexo feminino, mas sem diferença estatisticamente significativa e de acordo com outros estudos que descrevem uma incidência semelhante entre géneros (12) (16). Apesar da febre ser um dos vários sintomas de GEA, nenhuma criança infetada com astrovírus apresentava este sintoma, como relatado também num estudo anterior (179). Em relação à duração da diarreia, a infeção por astrovírus foi a que apresentou maior duração, comparativamente com a infeção por adenovírus e norovírus. Em relação a estudos anteriores, neste trabalho a duração média da diarreia foi superior (4,7 dias) e o número médio de episódios diários semelhante (20) (25) (26). A percentagem de crianças com vómitos (50%) está compreendida no intervalo esperado (20-70%), mas a duração média dos vómitos (dias) e o número de episódios diários foi superior ao relatado (20) (26). A percentagem de crianças infetadas por astrovírus desidratadas e o valor médio do grau de gravidade da diarreia está de acordo com dados de outros autores. Porém, estes mostram que as crianças infetadas apresentam uma atividade mais reduzida, e no nosso estudo todas as crianças tinham uma atividade normal (20) (26). A maior incidência de astrovírus ocorreu na época das



chuvas, mas sem diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,088$ ). Este resultado está de acordo com o revisto por Bosh *et al.* (2014) para os climas tropicais (70).

Os HAstVs clássicos são classificados em oito serotipos (HAstV-1 a -8) com base na sua reatividade serológica e neutralização (26), cada um deles correspondendo a um genótipo individual com base na sequência nucleotídica do gene da cápside (ORF2) (150). A análise filogenética das sequências da região 5' da ORF2 dos astrovírus analisados permitiu identificar a circulação de três genótipos diferentes (HAstV-1, -3 e -5). Curiosamente, HAstV-5 foi o genótipo predominante (43%, 3/7) neste pequeno número de amostras analisadas. A nível global, HAstV-1 é o genótipo mais comum identificado em crianças, seguido dos genótipos 2-5 e, ocasionalmente, 8 dependendo da região, enquanto HAstV-6 e -7 são raramente detetados (26) (70) (74).

Os HAstVs apresentam uma elevada taxa evolutiva, determinada pela acumulação de mutações ( $2-4 \times 10^{-3}$  substituições por posição por ano) (180) e pela capacidade de recombinação do genoma, comum a outros vírus de RNA (181). Curiosamente, e apesar da baixa inferência filogenética da árvore construída para as sequências da ORF1b relativamente à da ORF2, verificámos que apenas para dois vírus (B20 e C31), classificados como HAstV-1 nas duas regiões analisadas, o seu posicionamento se mantinha nas duas árvores construídas (Fig. 3.9 e 3.11). Para as sequências das amostras CSP17, M47, B19, B23 e M36 observou-se uma distribuição topológica discrepante nas árvores filogenéticas geradas, evidenciando genótipos diferentes para as duas regiões genómicas analisadas. As discrepâncias entre as árvores filogenéticas baseadas em diferentes ORFs sugerem potenciais eventos de recombinação nos genomas destas estirpes. Assim teremos putativos recombinantes de HAstV-1/-5 (CSP17, M47), HAstV-1/-3 (B19, B23) e HAstV-2/-5 (M36) para HAstV-ORF1b/-ORF2, respetivamente. Babkin *et al.* (2014) procederam à análise de eventos de recombinação de genomas completos de astrovírus humanos existentes nas bases de dados e de isolados russos tendo concluído que os HAstV-2 emergiram como resultado de recombinação e que os genótipos HAstV-1 e -4 incluem isolados recombinantes e não recombinantes, enquanto HAstV-3, -5 e -6 não apresentam sinais de recombinação (84). Curiosamente, a primeira evidência de recombinação entre HAstVs respeita a um recombinante entre HAstV-3 na ORF1b e HAstV-5 na ORF2, isolado de uma criança

com GEA nos EUA em que só foi analisada a região de junção entre aquelas duas ORFs (83). Recentemente, também com base em sequências parciais das três ORFs, foi identificado um putativo HAsV recombinante numa criança queniana com GEA sendo a ORF1a do genótipo 6/7, a ORF1b do genótipo 3 e a ORF2 do genótipo 2 (85). Outros potenciais recombinantes intergenótipos de HAsVs para a ORF1a e a ORF2 envolvendo os genótipos 1, 2, 3 e 8 foram descritos na Índia (87). Eventos de recombinação foram igualmente detetados em astrovírus animais (182). Considerando que a recombinação desempenha um papel importante na emergência de novas estirpes de HAsVs, julgamos importante a confirmação e caracterização dos potenciais astrovírus recombinantes identificados nas amostras Angolanas. Numa primeira fase, uma vez que foram identificados *hotspots* de recombinação nas regiões de junção das ORFs (84), poderemos proceder à amplificação e sequenciação de uma região que abranja a junção ORF1b/ORF2 como descrito por Walter *et al.* (2001) (83), seguido de análise por, *e.g.*, *Bootscan* e *Simplot*. Posteriormente, deverá ser adquirida e analisada a sequência completa do genoma destes vírus.

Ainda, a sequência da ORF1b de HMC8 agrupa-se com uma sequência de um HAsV recombinante (KF039911) (Fig. 3.9). Este HAsV, isolado de uma criança hospitalizada com GEA em Novosibirsk (Rússia), foi classificado como genótipo 3 para a ORF1b e como genótipo 2 para a ORF2 (84). Infelizmente, não conseguimos amplificar a ORF2 nesta amostra para podermos confirmar a circulação em África daquele isolado Russo.

Recentemente, foram identificados novos astrovírus, geneticamente não relacionados com os HAsVs canónicos, em amostras fecais humanas de diversos países (61) (63) (183) (64). Nas amostras analisadas não foram identificados estes novos astrovírus, apesar da utilização de *primers* universais com sensibilidade para amplificação de um fragmento da ORF1b e que foram usados originalmente na sua deteção (63). No entanto, a causa da impossibilidade de deteção destes astrovírus poderá residir a montante, uma vez que se usou como método de rastreio um ELISA comercial para deteção de antígenos virais e os anticorpos do ensaio poderão não reconhecer os antígenos dos novos astrovírus. De facto, estes novos astrovírus humanos incluídos nas espécies *Mamastrovirus* 6, 8, 9 e 20 parecem ter uma distribuição

universal e em África foram detetados na Nigéria (63), no Egipto (184) e no Burkina Faso (64). Uma pesquisa de astrovírus nas amostras fecais de Angola baseada em RT-PCR com *primers* universais poderá revelar a presença dos novos astrovírus humanos anteriormente descritos, ou não, e também, eventualmente, aumentar o número de amostras positivas para HAstV clássicos.

Relativamente à presença de norovírus nas amostras fecais de crianças Angolanas com gastroenterite, a taxa de deteção foi de 17% (37/222), valor muito próximo do estimado por Ahmed *et al.* (2014), que associa os norovírus a 14% das causas de GEA em países com elevada taxa de mortalidade (108). Contudo a taxa de deteção do estudo é ligeiramente superior à encontrada de um modo geral em África, cerca de 10% no Gana, na Etiópia e no Ruanda (22) (114) (162), 9,3% na Tunísia (185), 5,9% em Madagáscar (18), 14 % na Tanzânia (186) e 12% no Burquina Faso (140). Porém, nos Camarões, Egipto, Nigéria e Botswana, os norovírus foram responsáveis por 29%, 27%, 25% e 22%, respetivamente, dos casos de GEA (187) (161) (188) (189).

Como para os adenovírus e astrovírus, a maioria das crianças infetadas com norovírus (82,4%) tinha idade igual ou inferior a 24 meses, à semelhança do descrito na literatura (111) (113) (140). A infeção por norovírus foi mais prevalente no sexo feminino (60%) mas sem associação estatisticamente significativa ( $p=0,263$ ). Outros estudos detetaram maior prevalência no sexo masculino, mas também sem significado estatístico (185), pelo que se conclui que a infeção por norovírus deverá afetar de igual modo ambos os sexos. Quanto aos sintomas clínicos, nenhuma criança infetada por norovírus tinha febre, o que está em desacordo com outros estudos (140) (190). Neste trabalho, as crianças apresentavam uma duração média de diarreia de 2,7 dias, tendo, em média 3,9 episódios diários. Estudos anteriores mostram diarreias um pouco mais prolongadas ( $\approx 4$  dias) e com mais episódios diários ( $\approx 4,4$  episódios por dia) (114) (140) (190). A percentagem de crianças com vômitos, a média da sua duração e o número de episódios diários, tal como a percentagem de crianças desidratadas, foram semelhantes às encontradas nos estudos anteriormente referidos. O grau de gravidade da diarreia calculado por Colomba *et al.* (2006), apesar de ser mais elevado que o detetado neste estudo, é inferior a 12 (190). Ao contrário dos adenovírus e astrovírus, os norovírus apresentaram prevalência mais elevada na época seca, mas sem diferença

estatisticamente significativa ( $p=0,480$ ), como observado na África do Sul e no Gana (111) (191).

A detecção de norovírus por rt-RT PCR permitiu simultaneamente classificar 19% dos norovírus como genogrupo GI e 81% como genogrupo GII. Uma revisão sistemática da literatura entre 2004 e 20012, realizada por Hoa Tran e colaboradores (2013), estimou GII como o genogrupo com maior prevalência a nível mundial, sendo responsável por uma média de 96% das infeções esporádicas, enquanto GI corresponderia a 3,6% (101). Assim, nas amostras Angolanas, a infeção por GI surge acima da média global, com um valor próximo dos 16% observado no Malawi (192), mas abaixo dos 29% de Madagáscar e Egipto ou dos 33% do Iémen (18) (161) (193).

A análise filogenética da região NS de GI identificou dois genótipos da cápside, GI.3 e GI.5, os quais foram anteriormente descritos em crianças com GEA (18) (191). Os norovírus GI foram encontrados apenas no Huambo e pela análise da árvore filogenética da Fig. 3.15, verificamos a circulação de um conjunto de estirpes GI.3 estreitamente relacionadas, provavelmente resultantes da introdução de um ancestral comum, mas detetadas em amostras provenientes de três unidades de saúde diferentes. Recentemente, na Suécia, foi descrito um surto de GEA provocado por GI.3 (194). Observou-se ainda que os indivíduos eram infetados independentemente do seu estatuto ABO, secretor ou Lewis, resultados suportados por estudos bioquímicos com norovírus GI.3 que demonstram a sua capacidade de ligação a múltiplos glicanos (195). Estes dados poderão explicar o número elevado de amostras com GI.3 relativamente ao número de amostras com GI (5/6) ou mesmo às amostras totais com norovírus (5/37) da população Angolana analisada. A ligação aos antígenos HBGAs de não secretores parece ser mediada por uma ansa P mais longa e um resíduo Glu na posição 389 da cápside (196). Seria interessante determinar a sequência de aminoácidos da proteína da cápside destas estirpes GI.3 Angolanas e compará-las com as de outros norovírus GI.3 e também com as de outros genótipos GI caracterizados em termos de ligação aos antígenos HBGAs.

Relativamente aos norovírus GII, encontrou-se uma diversidade invulgar de genótipos. O genótipo mais comum foi GII.6 (30%, 9/30) seguido de GII.4 (26,7%, 8/30), representando no seu conjunto mais de metade dos norovírus GII identificados. A

nível global, a maioria dos estudos, identifica GII.4 como o genótipo de norovírus mais prevalente, estimando-se que GII.6 e GII.2, no seu conjunto, constituam cerca de 5% das estirpes circulantes (110) (112) (113) (191) (111) (101). Porém, prevalências de GII.6 de 17% e 40% foram encontradas, respetivamente, em 2008 na África do Sul e em 2008/2009 no Japão (111) (197). A análise da árvore filogenética da Fig. 3.16 mostra que as sequências GII.6 se distribuem por três subgrupos distintos bem suportado em termos filogenéticos, sugerindo várias introduções destes vírus e eventualmente a circulação de diferentes linhagens como identificado por Chan-It *et al.* (2012) (197). A obtenção de sequências completas da proteína da cápside destas estirpes e a sua comparação com sequências de GII.6 existentes nas bases de dados trará informação adicional sobre a epidemiologia deste genótipo.

A nível mundial, observa-se a predominância e persistência de variantes de norovírus GII.4, sendo responsáveis por 67% dos casos de GEA (101). Ainda, os norovírus GII.4 estão associados a índices elevados de morbilidade e mortalidade (124). No presente estudo, não se observou associação entre infeção por GII.4 e gravidade da diarreia.

Entre 1996 e 2013, sete variantes diferentes de GII.4 estiveram associadas a epidemias globais de gastroenterite com uma periodicidade de emergência de 2-3 anos e substituição da variante GII.4 anteriormente dominante. As novas variantes surgem através de deriva antigénica na proteína da cápside e recombinação genética entre estirpes pré-existentes (198). A análise filogenética das estirpes de norovírus GII (Fig. 3.16) mostra a cocirculação de três variantes GII.4 nos três distritos de Angola em estudo. Quatro amostras formam um agrupamento bem suportado (95% de *bootstrap*) com a variante *New Orleans 2009*. Embora com valores de *bootstrap* <75%, duas sequências surgem agrupadas com a variante *Sydney 2012* e outras duas com a estirpe *PA13/ITA 2013*. Para podermos determinar com maior suporte as relações filogenéticas entre variantes de norovírus GII.4 será necessário analisar sequências da região P2 da proteína da cápside, uma vez que as novas estirpes são geradas por variação neste domínio conducente a escape imune (199). É interessante verificar a circulação destas estirpes, mesmo em regiões mais remotas de Angola, numa janela temporal que coincide com a da sua primeira descrição. No entanto, alguns estudos retrospectivos

revelaram a circulação de estirpes GII.4, homólogas das associadas a grandes epidemias, vários anos antes destas serem identificadas como estirpes epidémicas globais (192) Estas três variantes foram igualmente descritas noutros países do continente Africano (140) (143). Curiosamente, a estirpe *PA13/ITA 2013* é um recombinante que possui a ORF1 de GII.4 *New Orleans 2009* e a ORF2 de GII.4 *Sydney 2012* (200), esta por sua vez já sendo um recombinante entre a variante *Osaka 2007* e a variante *Apeldoorn 2008* (201). De facto, estima-se que cerca de 27% das estirpes de norovírus GII sejam recombinantes com genótipos discordantes para a polimerase (ORF1) e a cápside (ORF2), sendo a junção ORF1/ORF2 um *hotspot* de recombinação (101). Seria interessante analisar esta região de junção nos norovírus GII angolanos, designadamente nas estirpes com maior circulação.

O terceiro genótipo mais prevalente do genogrupo II foi GII.7, com uma prevalência de 20% (6/30). Este genótipo também é associado a casos de GEA, e já foi detetado em alguns países (14) (56) (115). GII.3, o segundo genótipo dominante em crianças com GEA em muitos países e estimado como sendo responsável por cerca de 16,3% dos casos de doença (101), foi detetado em apenas duas amostras (7%, 2/30).

Tanto quanto sabemos, este é o primeiro trabalho desenvolvido em Angola com o objetivo de identificar vírus entéricos patogénicos, para além dos rotavírus, que infetam crianças com idade igual ou inferior a 5 anos com GEA. Conclui-se que no seu conjunto os adenovírus, astrovírus e norovírus estão presentes em cerca de um terço (29,7%) das amostras fecais das crianças com diarreia incluídas no estudo. No sentido de melhor avaliar o seu papel como agentes causadores de GEA, será igualmente importante analisar a prevalência e genótipos destes vírus num grupo controlo assintomático. Os resultados apresentados mostram uma grande variedade de genótipos de adenovírus, astrovírus e norovírus em circulação nestas populações de Angola. A análise de outras regiões dos diversos genomas virais para identificação de potenciais recombinantes poderá aumentar ainda esta diversidade e revelar novas variantes. Como a vacina de rotavírus foi introduzida em Angola em 2014, espera-se uma redução da taxa de deteção de rotavírus, e por isso é fundamental identificar e caracterizar, mesmo que parcialmente, os agentes etiológicos de GEA desconhecidos, de modo a compreender a sua epidemiologia e estabelecer medidas que reduzam a GEA na população pediátrica.

## **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. **Elliott, E. J.** 2007. Acute gastroenteritis in children. *British Medical Journal*. **334**:35-40.
2. **World Health Organization**, Health Topics: Diarrhoea. [Online] Março 2014. <http://who.int/topics/diarrhoea/en/>.
3. **Keusch, G.T., Fontaine, O., Bhargava, A., Boschi-Pinto, C., Bhutta, Z.A., Gotuzzo, E., Rivera, J.A., Chow, J., Shahid-Salles, S.A., Laxminarayan, R.** 2006. Disease Control Priorities in Developing Countries. **19**: 371-387.
4. **Sillah, F., Ho, H.J., Chao, J.C.J.** 2013. The use of oral rehydration salt in managing children under 5 y old with diarrhoea in the Gambia: Knowledge, attitude, and practice. *Nutrition*. **29**: 1368-1373.
5. **Liu, L., Johnson, H.L., Cousens S., Perin J., Scott, S., Lawn, J.E, Rudan I., Campbell H., Cibulskis R., Li M., Mathers C., Black R.E.** 2012. Global, regional, and national causes of child mortality: an updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*. **379**:2151–61.
6. **The United Nations Children’s Fund (UNICEF)/World Health Organization (WHO).** 2009. Diarrhea: Why children are still dying and what can be done. WHO Press. 4-7.
7. **Walker, C.L.F., Perin J., Aryee M.J., Boschi-Pinto C., Black R.E.** 2012. Diarrhea incidence in low- and middle-income countries in 1990 and 2010: a systematic review. *BioMed Central Public Health*. **12**:220.
8. **Kotloff, K.L., Nataro, J.P., Blackwelder, W.C., Nasrin, D., Farag, T.H., Panchalingam, S., Wu, Y., Sow, S.O., Sur, D., Breiman, R.F., Faruque, A.S.G., Zaidi, A.K.M., Saha, D., Alonso, P.L., Tamboura, B., Sanogo, D., Onwuchekwa, U., Manna, B., Ramamurthy, T., Kanungo, S., Ochieng, J.B., Omore, R., Oundo, J.O., Hossain, A., Das, S.K., Ahmed, S., Qureshi, S., Quadri, F., Adegbola, R.A., Antonio, M., Hossain, M.J., Akinsola, A., Mandomando, I., Nhampossa, T., Acácio S., Biswas, K., O'Reilly, C.E., Mintz, E.D., Berkeley, L.Y., Muhsen, K., Sommerfelt, H., Robins-Browne, R.M., Levine, M.M.,** 2013. Burden and aetiology of

diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries: a prospective, case-control study. *The Lancet*. **382**: 209-222.

9. **Black, E.R., Allen, L.H.A., Bhutta, Z., Caulfield, L.E, Onis, M., Ezzati M., Mathers, C., Rivera, J.** 2008. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *The Lancet*. **371**: 243-260.

10. **The United Nations Children's Fund (UNICEF)/World Health Organization (WHO).** 2013. End preventable deaths: Global Action Plan for Prevention and Control of Pneumonia and Diarrhoea.

11. **World Health Organization**, Angola: Health profile. [Online] Dezembro 2013. <http://who.int/gho/countries/ago.pdf?ua=1>.

12. **Nguyen, T.A., Yagyu, F., Okame, M., Phan, T.G., Trinh, Q.D., Yan, H., Hoang, K.T., Cao, A.T.H., Le Hoang, P., Okitsu, S., Ushijima, H.** 2007. Diversity of Viruses Associated With Acute Gastroenteritis in Children Hospitalized With Diarrhea in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Journal of Medical Virology* **79**:582–590.

13. **Wilhelmi, I., Roman, E., Sánchez-Fauquier, A.** 2003. Viruses causing gastroenteritis. *Clinical Microbiology and Infection*. **9**:247-262.

14. **Ferreira, M.S.R., Xavier, M.P.T.P., Tinga, A.C. C., Rose, T.L., Fumian, T.M., Fialho, A.M., Assis, R.M., Costa, F.A.C., Oliveira, S.A., Leite, J.P.G., Miagostovich, M.P.** 2012. Assessment of Gastroenteric Viruses Frequency in a Children's Day Care Center in Rio De Janeiro, Brazil: A Fifteen Year Study (1994–2008). *PLoS ONE*. **7**:1-7.

15. **Ham H., Oh, S., Jang, J., Jo, S., Choi, S., Pak, S.** 2013. Prevalence of Human Astrovirus in Patients with Acute Gastroenteritis. *Annals of Laboratory Medicine*. **34**:145-147.

16. **Liu, M.Q, Yang, B.F, Peng, J.S., Zhou, D. J., Tang, L., Wang, B.,Yu Liu, Y., Sun, S.H., Ho, W. Z.** 2007. Molecular Epidemiology of Astrovirus Infection in Infants in Wuhan, China. *Journal of Clinical Microbiology*. **45**: 1308-1309

17. **Magwalivha M., Wolfaardt M., Kiulia N. M., Van Zyl W.B., Mwenda J.M., Taylor M.B.** 2010. High Prevalence of Species D Human Adenoviruses in Fecal Specimens From Urban Kenyan Children With Diarrhea. *Journal of Medical Virology* **82**:77–84.



18. **Papaventsis D.C., Dove W., Cunliffe N.A., Nakagomi O., Combe P., Grosjean P., Hart C.A.** 2007. Norovirus Infection in Children with Acute Gastroenteritis, Madagascar, 2004–2005. *Emerging Infectious Diseases*. **13**: 908-911.
19. **Sriwanna P., Chieochansin T., Vuthitanachot C., Vuthitanachot V., Theamboonlers A., Poovorawan Y.** .2013. Molecular characterization of human adenovirus infection in Thailand, 2009–2012. *Virology Journal*.**10**:193.
20. **Chhabra, P., Payne, D.C., Szilagyi, P.G., Edwards, K.M., Staat, M.A., Shirley, S.A., Wikswo, M., Nix, W.A., Lu, X., Parashar, U.D., Vinjé, J.** 2013. Etiology of Viral Gastroenteritis in Children <5 Years of Age in the United States, 2008–2009. *The Journal of Infectious Diseases*. **208**:790-800.
21. **Dey S. K., Shimizu H., Phan T.G., Hayakawa Y., Islam A. , Faiz A., Salim M. , Khan A.R. , Mizuguchi M. , Okitsu S., Ushijima H.** 2009. Molecular epidemiology of adenovirus infection among infants and children with acute gastroenteritis in Dhaka City, Bangladesh. Elsevier. *Infection, Genetics and Evolution*. **9**:518-522.
22. **Reither K., Ignatius R., Weitzel T., Seidu-Korkor A., Anyidoho L., Saad E., Djie-Maletz A., Ziniel P., Amoo-Sakyi F., Danikuu F., Danour S., Otchwemah R. N, Schreier E., Bienzle U., Stark K., Mockenhaupt F.P.** 2007. Acute childhood diarrhoea in northern Ghana: epidemiological, clinical and microbiological characteristics. *BioMed Central*. **7**:104.
23. **Mandelboim, M., Dror, P., Azar, R., Bromberg, M., Mendelson, E.** 2011. Adenovirus Infections in Hospitalized Patients in Israel: Epidemiology and Molecular Characterization. *Journal of Clinical Microbiology*. **49**:597-601.
24. **Echavarría, Marcela.** 2008. Adenoviruses in Immunocompromised Hosts. *Clinical Microbiology Reviews*. **21**: 704-715.
25. **Jeong H. S., Jeong A., Cheon D-S.** 2012. Epidemiology of astrovirus infection in children. *The Korean Pediatric Society*. **55**:77-82.
26. **Méndez E. e Arias C.F.** 2013. Astroviruses. *Fields Virology*. Lippincott Williams&Wilkins. 6ª Edição. 609-627.
27. **Green, K.Y.** 2013. Caliciviridae: The Noroviruses. *Fields Virology*. Lippincott Williams&Wilkins. 6ª Edição. 582-604.
28. **World Health Organization,** Diarrhoeal disease (Fact Sheet N°330). [Online] Dezembro 2013. <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>.

29. **The United Nations Children's Fund (UNICEF).** 2012. Pneumonia and diarrhea-tackling the deadliest diseases for the world's poorest children. EUA: UNICEF.
30. **King, A.M.Q.** 2012. Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses. 9<sup>th</sup> Report of the international Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier.
31. **Lenman, A., Liaci, A.M., Liu, Y., Ardahl, C., Rajan, A., Nilsson E., Bradford, W., Kaeshammer L., Jones, M.S., Frängsmyr, L., Feizi, T., Stehle, T., Arnberg, N.** 2015. Human Adenovirus 52 Uses Sialic Acid Acidcontaining Glycoproteins and the Cocksackie and Adenovirus Receptor for Binding to Target Cells. PLoS Pathogens. **10**:1-23.
32. **Madisch, I., Harste, G., Pommer H., Heim, A.** 2005. Phylogenetic Analysis of the Main Neutralization and Hemagglutination Determinants of All Human Adenovirus Prototypes as a Basis for Molecular Classification and Taxonomy. Journal of Virology. **79**: 15265-15276.
33. **Crawforf-Miksza, L., Schnurr, D.P.** 1996. Analysis of 15 Adenovirus Hexon Proteins Reveals the Location and Structure of Seven Hypervariable Regions Containing Serotype-Specific Residues. Journal of Virology. **70**:1836-1844.
34. **Ebner, K., Pinsker, W., Lion, T.** 2005. Comparative Sequence Analysis of the Hexon Gene in the Entire Spectrum of Human Adenovirus Serotypes: Phylogenetic, Taxonomic, and Clinical Implications. Journal of Virology. **79**:12635-12642.
35. **Martín, Carmen San.** 2012. Latest Insights on Adenovirus Structure and Assembly. Viruses. **4**:847-877.
36. **Tiemessen, C.T., Kidd, A.H.** 1995. The subgroup F adenoviruses. Journal of General Virology. **76**:481-497.
37. **Norkin, Leonard C.** 2010. Adenoviruses. Virology: Molecular Biology and Pathogenesis. ASM Press, Chapter 17: 444-470.
38. **Jones II, M.S., Harrach, B., Ganac, R.D., Gozum, M.A.M., Cruz, W.P., Riedel, B., Pan, C., Delwart, E.L., Schnurr, D.P.** 2007. New Adenovirus Species Found in a Patient Presenting with Gastroenteritis. Journal of Virology. **81**:5978-5984.
39. **Russel, W.C.** 2000. Update on adenoviruses and its vectors. Journal of General Virology. **81**: 2573-2604.
40. **Zhang Y., Bergelson J.M.** 2005. Adenovirus Receptors. Journal of Virology. **79**:12125-12131

41. **Lenaerts L., De Clercq E., Naesens L.** 2008. Clinical features and treatment of adenovirus infections. *Reviews in Medical Virology*. **18**:357-374.
42. **Berk, A.J.** 2013. Adenoviridae. *Fields Virology*, Lippincott Williams&Wilkins. 6ª Edição. pp. 1704-1731.
43. **Filho E.P., Faria N.R.C., Fialho A.M., Assis R.S., Almeida M.M.S., Rocha M., Galvão M., Santos F.B., Barreto M., Leite J.P.G.** 2007. Adenoviruses associated with acute gastroenteritis in hospitalized and community children up to 5 years old in Rio de Janeiro and Salvador, Brazil. *Journal of Medical Microbiology*. **56**: 313–319.
44. **Dey R. S., Ghosh S., Chawla-Sarkar M., Panchalingam S., Nataro J. P., Sur D., Manna B., Ramamurthy T.** 2011. Circulation of a Novel Pattern of Infections by Enteric Adenovirus Serotype 41 among Children below 5 Years of Age in Kolkata, India. *Journal of Clinical Microbiology*. **49**:500-505.
45. **Rosa, G.L., Iaconelli, M., Pourshaban, M., Luca, E., Valentini, P., Sica, S., Manzara, S., Delogu, G., Muscillo, M.** 2011. Molecular characterization of adenovirus from clinical samples through analysis of the hexon and fiber genes. *Journal of General Virology*. **92**:412-420.
46. **Shimizu, H., Phan, T.G., Nishimura, S., Okitsu, S., Maneekarn, N., Ushijima, H.** 2007. An outbreak of adenovirus serotype 41 infection in infants and children with acute gastroenteritis in Maizuru City, Japan. *Infection, Genetics and Evolutions*. **7**: 279-284.
47. **Moore, P.L., Steele, A.D., Alexander, J.J.** 2000. Relevance of Commercial Diagnostic Tests to Detection of Enteric Adenovirus Infections in South Africa. *Journal of Clinical Microbiology*. **38**: 1661-1663.
48. **Garnett, C.T., Erdman, D., Xu, W., Gooding, L.R.** 2002. Prevalence and Quantitation of Species C Adenovirus DNA in Human Mucosal Lymphocytes. *Journal of Virology*. **76**:10608-10616.
49. **Hierholzer, J.C.** 1992. Adenoviruses in the Immunocompromised Host. *Clinical Microbiology Reviews*. **5**:262-274.
50. **Lord, A., Bailey, A.S., Klapper, P.E., Snowden, N., Khoo, S.H.** 2000. Impaired Humoral Responses to Subgenus D Adenovirus Infections in HIV-positive Patients. *Journal of Medical Virology*. **62**:405-409.

51. **Alkhalaf, M.A., Al Qurashi, Y.M.A, Guiver, M., Cooper, R.J.** 2014. Genome Sequences of Three Species D Adenoviruses Isolated from AIDS Patients. *Genome Announcements*. **2**:1-2
52. **Matsushima Y., Shimizu H., Kano A., Nakajima E., Ishimaru Y., Dey S.K., Watanabe Y., Adachi F., Suzuki K., Mitani K., Fujimoto T., Phan T.G., Ushijima H.** 2012. Novel Human Adenovirus Strain, Bangladesh. *Emerging Infectious Diseases*. **18**:846-848.
53. **Matsushima Y., Shimizu H., Kano A., Nakajima E., Ishimaru Y., Dey S.K., Watanabe Y., Adachi F., Mitani K., Fujimoto T., Phan T.G., Ushijima H.** 2013. Genome Sequence of a Novel Virus of the Species Human Adenovirus D Associated with Acute Gastroenteritis. *Genome Announcements*. **1**: 1-2.
54. **Andreasi M.S.A., Cardoso D.D.P., Fernandes S.M., Tozetti I.A., Borges A.M. T., Fiaccadori F.S., Santos R.A.T., Souza, M.** 2008. Adenovirus, calicivirus and astrovirus detection in fecal samples of hospitalized children with acute gastroenteritis from Campo Grande, MS, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*. **103**:741-744.
55. **Basu G., Rossouw, J., Sebunya, T.K., Gashe, B.A., De Beer, M., Dewar, J.B., Steele, A.D.** 2003. Prevalence of Rotavirus, Adenovirus and Astrovirus infection in young children with gastroenteritis in Gaborone, Botswana. *East African Medical Journal*. **80**:652-655.
56. **Ren, Z., Kong, Y., Wang J., Wang, Q., Huang, A., Xu, H.** 2013. Etiological study of enteric viruses and the genetic diversity of norovirus, sapovirus, adenovirus, and astrovirus in children with diarrhea in Chongqing, China. *BMC Infectious Diseases*. **13**:412.
57. **Carraturo, A., Catalani, V., Tega, L.** 2008. Microbiological and epidemiological aspects of Rotavirus and enteric Adenovirus infections in hospitalized children in Italy. *New Microbiologica*. **31**: 329-336.
58. **Appleton, H. e Higgins, P.G.** 1975. Letter: Viruses and gastroenteritis in infants. *The Lancet*. **i**: 1297.
59. **Madeley, C.R., Cosgrove, B.P.** 1975. Letter: 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *The Lancet*. **6**:451-452

60. **Finkbeiner S.R., Allred A.F., Tarr, P. I., Klein, E.J., Kirkwood, C.D., Wang, D.** 2008. Metagenomic Analysis of Human Diarrhea: Viral Detection and Discovery. *PLoS ONE*. **4**: 1-9.
61. **Finkbeiner S.R., Le, B.M., Holtz, L.R, Storch G.A., Wang D.** 2009. Detection of Newly Described Astrovirus MLB1 in Stool Samples from Children. *Emerging Infectious Diseases*. **15**: 441-444.
62. **Finkbeiner S.R., Holtz, L.R., Jiang, Y., Rajendran P., Franz, C.J., Zhao, G., Kang, G., Wang, D.** 2009. Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel astroviruses. *Virology Journal*. **6**:1-5.
63. **Kapoor, A., Li, L., Victoria, J., Oderinde, B., Mason, C., Pandey, P., Zaidi, S.Z., Delwart, E.** 2009. Multiple novel astrovirus species in human stool. *Journal of General Virology*. **90**: 2965-2972.
64. **Phan, T.G., Nordgren, J., Ouermi, D., Simpure, J., Nitiema, L.W., Deng, X., Delwart, E.** 2014. New astrovirus in human feces from Burkina Faso. *Journal of Clinical Virology*. **60**:161-164.
65. **Dryden, K.A., Tihova, M., Nowotny, N., Matsui, S.M., Mendez, E., Yeager, M.** Immature and Mature Human Astrovirus: Structure, Conformational Changes, and Similarities to Hepatitis E Virus. *Journal of Molecular Biology*. **422**: 650-658.
66. **Krishna, N.K., Carter, M.J., Willcocks, M.M.** 2011. Mamastrovirus. *Springer Index of Virus*. pp **97-103**.
67. **Méndez, E., Murillo, A., Velázquez, R., Burnham, A., Arias, C.F.** 2013. Replication Cycle of Astroviruses. *Springer*. **2**: 19-45.
68. **Jonassen, C.M., Jonassen T., Sveen, T.M., Grinde, B.** 2003. Complete genomic sequences of astroviruses from sheep and turkey: comparison with related viruses. *Virus Research*. **91**:19-201.
69. **Denison, Mark R.** 2008. Seeking Membranes: Positive-Strand RNA Virus Replication Complexes. *PLoS ONE*. **6**:2098-2100.
70. **Bosch, A., Pintó, R.M., Guix,S.** 2014. Human Astroviruses. *Clinical Microbiology*. **27**:1048-1074.
71. **Moser, Lindsey A. e Schultz-Cherry, Stacey.** 2005. Pathogenesis of Astrovirus Infection. *Viral Immunology*. **18**:4-10.

72. **Shastri, S., Doane, A.M., Gonzales, J., Upadhyayula, U., Bass, D.M.** 1998. Prevalence of Astroviruses in a Children's Hospital. *Journal of Clinical Microbiology*. **36**:2571-2574.
73. **Guix, S., Caballero, S., Villena, C., Bartolomé, R., Latorre, C., Rabella, N., Simó, M., Bosch, A., Pintó, R.M.** 2002. Molecular Epidemiology of Astrovirus Infection in Barcelona, Spain. *Journal of Clinical Microbiology*. **40**:133-139.
74. **Benedictis, P., Schultz-Cherry, S., Burnham, A., Cattoli, G.** 2011. Astrovirus infections in humans and animals – Molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infection, Genetics and Evolution*. **11**: 1529-1544.
75. **Guo, L., Xu, X., Song, J., Wang, W., Wang, J., Hung, T.** 2010. Molecular Characterization of Astrovirus Infection in Children With Diarrhea in Beijing, 2005–2007. *Journal of Medical Virology*. **82**:415-423.
76. **Cunliffe, Nigel A. e Glass, Roger I.** 1996. Gastrointestinal manifestations of HIV infection. *The Lancet*. **348**:1037.
77. **Maldonado, Y., Cantwell M., Old, M., Hill D., Sanchez, M.L., Logan, L., Millan-Velasco, F., Valdespino, J.L., Sepulveda, J., Matsui, S.** 1998. Population-Based Prevalence of Symptomatic and Asymptomatic Astrovirus Infection in Rural Mayan Infants. *The Journal of Infectious Diseases*. **178**:334-339.
78. **Ayolabi, C.I., Ojo, D.A., Akpan, I.** 2012. Astrovirus infection in children in Lagos, Nigeria. *Journal of Infectious Diseases*. **6**: 1-4.
79. **Afrad, M.H., Karmakar, P.C., Das, S.K., Matthijnssens, J., Ahmed F., Nahar, S., Faruque, A.S.G., Rahman, M.Z., Rahman, M., Azim, T.** 2013. Epidemiology and genetic diversity of human astrovirus infection among hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh from 2010 to 2012. *Journal of Clinical Virology*. **58**:612-618.
80. **Mustafa, H., Palombo, E.A., Bishop, R.F.** 2000. Epidemiology of Astrovirus Infection in Young Children Hospitalized with Acute Gastroenteritis in Melbourne, Australia, over a Period of Four Consecutive Years, 1995 to 1998. *Journal of Clinical Microbiology*. **38**:1058-1062.
81. **Palombo, Enzo A, Bishop, Ruth F.** 1996. Annual Incidence, Serotype Distribution, and Genetic Diversity of Human Astrovirus Isolates from Hospitalized Children in Melbourne, Australia. *Journal of Clinical Microbiology*. **34**: 17550-17553.

82. **Papaventsis, D.C., Dove, W., Cunliffe, N.A., Nakagomi, O., Combe, P., Grosjean, P., Hart, C.A.** 2008. Human Astrovirus Gastroenteritis in Children, Madagascar, 2004–2005. *Emerging Infectious Diseases*. **14**: 844-846.
83. **Walter J.E., Mitchell, D.K., Guerrero, M.L., Berke, T., Matson, D.O., Monroe, S.S., Pickering, L.K., Ruiz-Palacios, G.** 2001. Molecular Epidemiology of Human Astrovirus Diarrhea among Children from a Periurban Community of Mexico City. *The Journal of Infectious Diseases*. **183**: 681-686.
84. **Babkin, I.V., Tikunov, A.Y., Sedelnikova, D.A., Zhirakovskaia, E.V., Tikunova, N.V.** 2014. Recombination analysis based on the HAsV-2 and HAsV-4 complete genomes. *Infection, Genetics and Evolution*. **22**: 94-102.
85. **Wolfaardt, M., Kiulia, N.M., Mwenda, J.M., Taylor, M.B.** 2011. Evidence of a Recombinant Wild-Type Human Astrovirus Strain from a Kenyan Child with Gastroenteritis. *Journal of Clinical Microbiology*. **49**: 728-731.
86. **Krishnam, Thiba.** 2014. Novel human astroviruses: challenges for developing countries. *Virus Disease*. **25**: 208-214.
87. **Pativada, M.S., Chatterjee, D., Mariyappa, N.S., Rajendran, K., Bhattacharya, M.K., Ghosh, M., Kobayashi, N., Krishnan, T.** 2011. Emergence of unique variants and inter-genotype recombinants of human astroviruses infecting infants, children and adults in Kolkata, India. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*. **2**: 228-235.
88. **Jiang, H., Holtz, L.R., Bauer, I., Franz, C.J., Zhao, G., Bodhidatt, L., Shrestha, S.K., Kang, G., Wang, D.** 2013. Comparison of novel MLB-clade, VA-clade and classic human astroviruses highlights constrained evolution of the classic human astrovirus nonstructural genes. *Virology*. **436**: 8-14.
89. **Burbelo, P.D., Ching, K.H., Esper, F., Iadarola, M.J., Delwart, E., Lipkin, W.I., Kapoor, A.** 2011. Serological Studies Confirm the Novel Astrovirus HMOAsV-C as a Highly Prevalent Human Infectious Agent. *PLoS ONE*. **6**: 1-5.
90. **Bányai, K., Meleg, E., Moschidou, P., Martella, V.** 2010. Detection of Newly Described Astrovirus MLB1 in Stool Samples from Children. *Emerging Infectious Diseases*. **16**: 169.

91. **Medici, M.C., Tummolo, F., Calderaro, A., Elia, G., Bányai, K., Conto, F., Arcangeletti, M.C., Chezzi, C., Buonavoglia, C., Martella, V.** 2014. MLB Astrovirus in Children with Gastroenteritis, Italy. *Emerging Infectious Diseases*. **20**:169.
92. **Holtz, L.R., Bauer, I.K., Rajendran, P., Kang, G., Wang, D.** 2011. Astrovirus MLB1 Is Not Associated with Diarrhea in a Cohort of Indian Children. *PLoS ONE*. **6**:1-3.
93. **Chu, D.K.W., Chin, A.W.H., Smith, G.J., Chan, K., Guan, Y., Peiris, J.S.M., Poon, L.L.M.** 2010. Detection of novel astroviruses in urban brown rats and previously known astroviruses in humans. *Journal of General Virology*. **91**:2457-2462.
94. **Adler J.L e Zickl R.** 1969. Winter vomiting disease. *The Journal of Infectious Diseases*. **119**:668-673.
95. **Kapikian, A.Z., Wyatt, R.G., Dolin, R., Thornhill, T.S., Kalica, A.R., Chanock, R.M.** 1972. Visualization by Immune Electron Microscopy of a 27-nm Particle Associated with Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis. **10**:1075-1081.
96. **Vinje, J., Green, J., Lewis, D.C., Gallimore, C.I., Brown, D.W., Koopmans, M.P.** 2000. Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of "Norwalk-like viruses". *Archives of Virology*. **145**:223-241.
97. **Zheng, D., Ando, T., Fankhauser, R.L., Beard, R.S., Glass, R.I., Monroe, S.S.** 2006. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*. **346**:312-323.
98. **Kroneman, A., Vega, E., Vennema H., Vinje, J., White, P.A., Hansman, G., Green, K., Martella, V., Katayama, K., Koopmans, M.** 2013. Proposal for a unified norovirus nomenclature and genotyping. *Archives of Virology*. **158**:2059-2068.
99. **Taube, S., Rubin, J.R., Katpally, U., Smith, T.J., Kendall, A., Stuckey, J.A., Wobus, E.** 2010. High-Resolution X-Ray Structure and Functional Analysis of the Murine Norovirus 1 Capsid Protein Protruding Domain. *Journal of Virology*. **84**:5695-5705.
100. **Simmonds, P., Karakasiliotis, I., Bailey, D., Chaudhry, Y., Evans, D.J., Goodfellow, I.G.** 2008. Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses. *Nucleic Acids Research*. **36**:2530-2546.



101. **Hoa Tran, T.N., Trainor, E., Nakagomi, T., Cunliffe, N., Nakagomi, O.** 2013. Molecular epidemiology of noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: Global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants. *Journal of Clinical Virology*. **56**: 185-193.
102. **Naphtine, S., Lever, R.A., Powell, M.L., Jackson, R.J., Brown, T.D.K., Brierley, I.** 2009. Expression of the VP2 Protein of Murine Norovirus by a Translation Termination-Reinitiation Strategy. *PLoS ONE*. **4**:1-10.
103. **Tan, Ming e Jiang Xi.** 2005. Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle. *Trends in microbiology*. **13**:285-293.
104. **Vashist, S., urena, I. Chaudhry, Y., Goodfellow, I.** 2012. Identification of RNA-Protein Interaction Networks Involved in the Norovirus Life Cycle. *Journal of Virology*. **86**:11977-11990.
105. **Hyde, J.L., Sosnovtsev, S.V., Green, K.Y., Wobus, C., Virgin, H.W., Mackenzie, J.M.** 2009. Mouse Norovirus Replication Is Associated with Virus-Induced Vesicle Clusters Originating from Membranes Derived from the Secretory Pathway. *Journal of Virology*. **83**:9709-9719.
106. **Thorne L.G., Goodfellow, I.** 2014. Norovirus gene expression and replication. *Journal of General Virology*. **95**:278-291.
107. **Patel M.M., Widdowson, M., Glass, R.I., Akazawa, K., Vinjé, J., Parashar, U.** 2008. Systematic Literature Review of Role of Noroviruses in Sporadic Gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases*. **14**:1224-1231.
108. **Ahmed, S.M., Hall, A.J., Robinson, A.E., Verhoef, L., Premkumar, P., Parashar, U.D, Koopmans, M., Lopman, B.A.** 2014. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*. **14**:725-730
109. **Lanata, C.F., Fischer-Walker, C., Olascoaga, A.C., Torres, C.X., Aryee, M.J., Black, R.E.** 2013. Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children <5 Years of Age: A Systematic Review. *PLoS ONE*. **8**:1-11.
110. **Jia, L., Qian, Y., Zhang, Y., Deng, L., Liu, L., Zhu, R., Zhao, L., Huang, H., Zheng C., Dong. H.** 2014. Prevalence and genetic diversity of noroviruses in outpatient pediatric clinics in Beijing, China 2010–2012. *Infection, Genetics and Evolution*. **28**:71-77.

111. **Mans J., Villiers, J.C., Plessis N.M., Avenant, T., Taylor, M.B.** 2010. Emerging norovirus GII.4 2008 variant detected in hospitalised paediatric patients in South Africa. *Journal of Clinical Virology*. **49**:258-264.
112. **Guo, L., Song, J., Xu, X. Ren, L., Li, J., Zhou, H., Wang, M., Qu, J., Wang J., Hung, T.** 2009. Genetic analysis of norovirus in children affected with acute gastroenteritis in Beijing, 2004–2007. *Journal of Clinical Virology*. **44**:94-98.
113. **Bucardo, F., Nordgren, J. Carlsson, B., Paniagua, M., Lindgren, P., Espinoza, F., Svensson, L.** 2008. Pediatric Norovirus Diarrhea in Nicaragua. *Journal of Clinical Microbiology*. **46**:2573-2580.
114. **Yassin, M.A., Kirby, A., Mengistu, A.A., Arbide, I., Dove, W., Beyer, M., Cunliffe, N.A., Cuevas, L.E.** 2012. Unusual norovirus and rotavirus genotypes in Ethiopia. *Paediatrics and International Child Health*. **32**:51-55.
115. **Mathijs, E., Denayer, S., Palmeira, L. Botteldoorn, N., Scipioni, A., Vanderplasschen A., Thiry, E., Dierick K.** 2011. Novel norovirus recombinants and of GII.4 sub-lineages associated with outbreaks between 2006 and 2010 in Belgium. *Virology Journal*. **8**:1-13.
116. **Patel, M.M., Hall, A.J., Vinjé, J., Parashar, U.D.** 2009. Noroviruses: A comprehensive review. *Journal of Clinical Virology*. **44**:1-8.
117. **Tran, A., Talmud, D., Lejeune, B., Jovenin, N., Renois, F., Payan, C., Leveque, N., Andreoletti, L.** 2010. Prevalence of Rotavirus, Adenovirus, Norovirus, and Astrovirus Infections and Coinfections among Hospitalized Children in Northern France. *Journal of Clinical Microbiology*. **48**:1943-1946.
118. **Lysén, M., Thorhagen, M., Brytting, M., Hjertqvist, M., Andersson, Y., Hedlund, K.** 2009. Genetic Diversity among Food-Borne and Waterborne Norovirus Strains Causing Outbreaks in Sweden. *Journal of Clinical Microbiology*. **47**:2411-2418.
119. **Seitz, S.R., Leon, J.S., Schwab, K.J., Lyon, G.M., Dowd, M., McDaniels, M., Abdulhafid, G., Fernandez, M.L., Lindesmith, L.C., Baric, R.S., Moe, C.L.** 2011. Norovirus Infectivity in Humans and Persistence in Water. *Applied and Environmental Microbiology*. **77**:6884-6888.
120. **Bitler, E.J., Matthews, J.E., Dickey, B.W., Eisenberg, J.N.S., Leon, J.S.** 2013. Norovirus outbreaks: a systematic review of commonly implicated transmission routes and vehicles. *Epidemiology and infection*. **141**:1563-1571.

121. **Matthews, J.E., Dickey B.W., Miller R.D., Felzer, J.R., dawson, B.P., Lee, A.S., Rocks, J.J. Kiel, J., Montes, J.S., Moe, C.L., Eisenberg, J.N.S., Leon, J.N.** 2012. The epidemiology of published norovirus outbreaks: a review of risk factors associated with attack rate and genogroup. *Epidemiology and infection.* **140**:1161-1172.
122. **Zheng, D., Widdowson, M., Glass, R.I., Vinjé, J.** 2010. Molecular Epidemiology of Genogroup II-Genotype 4 Noroviruses in the United States between 1994 and 2006. *Journal of Clinical Microbiology.* **48**:168-177.
123. **Ramani, S.R., Atmar, R.L., Estes M.K.,** 2014. Epidemiology of human noroviruses and updates on vaccine development. *Current Opinion in Gastroenterology.* **30**:25-33.
124. **Desai, R., Hembree, C.D., Handel, A., Matthews, J.E., Dickey, B.W., McDonald, S., Hall, A.J., Parashar, U.D., Leon, J.S., Lopman, B.** 2012. Severe Outcomes Are Associated With Genogroup 2 Genotype 4 Norovirus Outbreaks: Systematic Literature Review. **55**: 189-193.
125. **Bull, R., Tu, E.T.V., Melver, C.J., Rawlinson, W.D., White, P.A.** 2006. Emergence of a New Norovirus Genotype II.4 Variant Associated with Global Outbreaks of Gastroenteritis. *Journal of Clinical Microbiology.* **44**:327-333.
126. **Noel, J.S., Fankhauser, R.L., Ando, T., Monroe, S.S., Glass, R.I.** 1999. Identification of a Distinct Common Strain of “Norwalk-like Viruses” Having a Global Distribution. *The Journal of Infectious Diseases.* **179**: 1334-1344.
127. **Widdowson, M.A., Cramer, E.H., Hadley, L., Bresee, J.S., Beard, S., Bulens, S.N., Charles, M., Chege, W., Isakbaeva, E., Wright, J.G., Mintz, E., Forney, D., Massey, J., Glass, R.I., Monroe, S.S.** 2004. Outbreaks of Acute Gastroenteritis on Cruise Ships and on Land: Identification of a Predominant Circulating Strain of Norovirus—United States, 2002. *The Journal of Infectious Diseases.* **190**: 27-36.
128. **Lopman, B., Vennema, H., Kohli, E., pithier, P., Sanchez, A., Negredo, A., Buesa, J., Schreier, E., Reacher, M., Brown, D., Gray, J., Iturriza, M., Gallimore, C., Bottiger, B., Hedlund, K., Torvén, M., Bonsdorff, C.V., Maunula, L., Poljsak-Prijatelj, M., Zimsek, J., Reuter, G., Szücs, G., Melegh, B., Svennson, L., Duijnhoven, Y., Koopmans, M.** 2004. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic. *Lancet.* **363**:682-688.

129. **Medici, M.C., Martinelli, M., Abelli, L.A., Ruggeri, F.M., Bartolo, I.D., Arcangeletti, M.C., Pinardi, F., Conto, F., Izzi, G., Bernasconi, S., Chezzi, C., Dettori, G.** 2006. Molecular Epidemiology of Norovirus Infections in Sporadic Cases of Viral Gastroenteritis Among Children in Northern Italy. *Journal of Medical Virology*. **78**:1486-1492.
130. **Phan, T.G., Kuroiwa, T., Kaneshi, K., Ueda, Y., Nakaya, S., Nishimura, S., Yamamoto, A., Sugita, K., Nishimura T., Yagyu, F., Okitsu, S., Müller, W.E.G., Maneekarn, N., Ushijima, H.** 2006. Changing Distribution of Norovirus Genotypes and Genetic Analysis of Recombinant GIIb Among Infants and Children With Diarrhea in Japan. *Journal of Medical Virology*. **78**:971-978.
131. **Ramirez, S., Grazia, S., Giammanco, G. M., Milici, M., Colomba, C., Ruggeri, F. M., Martella, V., Arista, S.** 2006. Detection of the Norovirus Variants GGII.4 Hunter and GGIIb/Hilversum in Italian Children With Gastroenteritis. *Journal of Medical Virology*. **78**:1656-1662.
132. **Reuter, G., Pankovics, P., Szücs, G.** 2008. Genetic drift of norovirus genotype GII-4 in seven consecutive epidemic seasons in Hungary. *Journal of Clinical Virology*. **42**:135-140.
133. **Sdiri-Loulizi, K., Ambert-Balay, K., Gharbi-Khelifi, H., Sakly, N., Hassine, M., Chouchane, S., Neji Guediche, M., Pothier, P., Aouni, M.** 2009. Molecular Epidemiology of Norovirus Gastroenteritis Investigated Using Samples Collected from Children in Tunisia during a Four-Year Period: Detection of the Norovirus Variant GGII.4 Hunter as Early as January 2003. *Journal of Clinical Microbiology*. **47**:421-429.
134. **Okada, M., Tanaka, T., Oseto, M., Takeda, N., Shinozaki, K.** 2006. Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. *Archives of Virology*. **151**:1635-1641.
135. **Pang, X. L., Preiksaitis, J.K., Wong, S., Li, V., Lee, B.E.** 2010. Influence of Novel Norovirus GII.4 Variants on Gastroenteritis Outbreak Dynamics in Alberta and the Northern Territories, Canada between 2000 and 2008. *PLoS ONE*. **5**:1-8.
136. **Tu, E.T.V., Bull, R.A., Greening, G.E., Hewitt, J., Lyon M.J., Marshall J.A., McIver, C.J., Rawlinson W.D., White P.A.** 2008. Epidemics of Gastroenteritis during 2006 Were Associated with the Spread of Norovirus GII.4 Variants 2006a and 2006b. *Clinical Infectious Diseases*. **46**:413-420.

137. **Vega, E., Barclay, L., Gregoricus, N., Williams, K., Lee, D., Vinjé, J.** 2011. Novel Surveillance Network for Norovirus Gastroenteritis Outbreaks, United States. *Emerging Infectious Diseases*. **17**:1389-1395.
138. **Allen, D., Adams, N.L., Aladin, F., Harris, J.P., Brown, D.W.G.** 2014. Emergence of the GII-4 Norovirus Sydney2012 Strain in England, Winter 2012–2013. *PLoS ONE*. **9**:1-9.
139. **Giammanco, G.M., Grazia, S., Tummolo, F., Bonura, F., Calderaro, A., Buonavoglia, A., Martella, V., Medici, M.C.** 2013. Norovirus GII.4/Sydney/2012 in Italy, Winter 2012–2013. *Emerging Infectious Diseases*. **19**:1348-1349.
140. **Nordgren, J., Bucardo, F., Dienus, O., Svensson, L., Lindgren, P.E.** 2013. Novel Light-Up-on-Extension Real-Time PCR Assays for Detection and Quantification of Genogroup I and II Noroviruses in Clinical Specimens. *PLoS ONE*. **45**:1-10.
141. **Barclay, L., Wikswo, M., Gregoricus, N., Vinjé, V., Lopman, B., Parashar, U., Hall, A., Leshem, E.** 2013. Notes from the Field: Emergence of New Norovirus Strain GII.4 Sydney — United States, 2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*. **62**:55.
142. **Chan, M.C.W., Leung, T.F., Kwok, A.K., Lee, N., Chan, P.K.S.** 2014. Characteristics of Patients Infected with Norovirus GII.4 Sydney 2012, Kong, China. *Emerging Infectious Diseases*. **20**:658-661.
143. **Mans, J., Murray, T.Y., Taylor, M.B.** 2014. Novel norovirus recombinants detected in South Africa. *Virology Journal*. **11**:1-9.
144. **Qazoui, M.L., Oumzil H., Baassi, L., Omari, N.E., Sadki, K., Amzazi, S., Benhafid, M., Aouad, R.E.** 2014. Rotavirus and Norovirus infections among acute gastroenteritis children in Morocco. *BMC Infectious Diseases*. **14**:1-9.
145. **Rahman, M., Nahar, Afrad, M.H., Faruque, A.S.G., Azim, T.** 2013. Norovirus Variant GII.4/Sydney/2012, Bangladesh. *Emerging Infectious Diseases*. **19**: 1347-1348.
146. **Silva, L.D., Rodrigues, E.L., Lucena, M.S.S., Lima, I.C.G., Oliveira, D.S., Soares, L.S., Mascarenhas, J.D., Linhares, A.C., Gabbay, Y.B.** 2013. Detection of the pandemic norovirus variant GII.4 Sydney 2012 in Rio Branco, state of Acre, northern Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*. **108**:1068-1070.
147. **Centers for Disease Control and Prevention.** 2014. Norovirus: CaliciNet Data [Online] Novembro 2014. <http://www.cdc.gov/norovirus/reporting/calicinet/data.html>.

148. **PATH.** 2014. Rotavirus disease and vaccines in Angola. Vaccine Access and Delivery. PATH.
149. **Chu, D.K.W., Poon, L.L.M., Guan, Y., Peiris, J.S.M.** 2008. Novel Astroviruses in Insectivorous Bats. *Journal of Virology*. **82**:9107-9114.
150. **Noel, J.S., Lee, T.W., Kurtz, J.B., Glass, R.I, Monroe, S.S.** 1995. Typing of Human Astroviruses from Clinical Isolates by Enzyme Immunoassay and Nucleotide Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*. **33**:797-801.
151. **Nordgren, J., Bucardo, F., Dienus O., Svensson, L., Lindgren, P.** 2007. Novel Light-Up-on-Extension Real-Time PCR Assays for Detection and Quantification of Genogroup I and II Noroviruses in Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. **46**:164-170.
152. **World Health Organization.** 2014 Child Growth Standards. [Online] Novembro 2014. <http://www.who.int/childgrowth/software/en>.
153. **Nakagomi, T., Nakagomi, O., Takahashi, Y., Enoki, M., Suzuki, T., Paul E., Kilgore, P.E.** 2005. Incidence and Burden of Rotavirus Gastroenteritis in Japan, as Estimated from a Prospective Sentinel Hospital Study. *The Journal of Infectious Diseases*. **192**:106-110.
154. **Hall, Tom.** 1997-2013. BioEdit. [Online]. <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>.
155. **Nicholas K.B., Nicholas, H.B. Jr.** 1997. GeneDoc: a tool for editing and annouting multiple sequence alignments.
156. **National Center for Biotechnology Information.** BLAST [Online]. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>.
157. **Kroneman, A., Vennema, H., Deforche, K., Avoort, H.V.D., Peñaranda, S., Oberste, M.S., Vinjé, S., Koopmans, M.** 2011. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *Journal of clinical Virology*. **51**:121-125.
158. **Tamura, K.** 1993-2014 MEGA. [Online]. <http://www.megasoftware.net/>.
159. **Li, L., Shimizu, H., Doan, L.T.P, Tung, P.G., Okitsu, S., Nishio, O., Suzuki, E., Seo, J.K., Kim, K.S., Müller, W.E.G., Ushijima, H.** 2004. Characterizations of Adenovirus Type 41 Isolates from Children with Acute Gastroenteritis in Japan, Vietnam, and Korea. *Journal of Clinical Microbiology*. **42**:4032-4039.

160. **Lamberti, L.M, Walker, C.L.F., Noiman, A., Victora, C., Black R.E.** 2011. Breastfeeding and the risk for diarrhea morbidity and mortality. *BMC Public Health*. **11**: (Suppl 3).
161. **Kamel, A.H., Ali, M.A., El-Nady, H.G., Rougemont, A., Pothier, P, Belliot, G.** 2009. Predominance and Circulation of Enteric Viruses in the Region of Greater Cairo, Egypt. *Journal of Clinical Microbiology*. **47**: 1037-1045.
162. **Kabayiza, J.C., Andersson, M.E., Nilsson, S., Bergström, T., Muhirwa, G., Lindh, M.** 2014. Real-time PCR identification of agents causing diarrhea in Rwandan children less than 5 years of age. *Pediatric Infectious Disease Journal*. **33**:1037-1042.
163. **Wu, W., Yang, H., Zhang, H., Xian, H., Yao, X., Zhao, D-J., Chen, L., Shu, B., Zhou, Y., He, Y.** 2014. Surveillance of pathogens causing gastroenteritis and characterization of norovirus and sapovirus strains in Shenzhen, China, during 2011. *Archives of Virology*. **159**:1995-2002.
164. **Moore, P., Steele, A.D., Lecatsas, G., Alexander, J.J.** 1998. Characterisation of gastro-enteritis-associated adenoviruses in South Africa. *South African Medical Journal*. **88**:1587-1592.
165. **Lee, J.I., Lee, G.C., Chung, J.Y., Han, T.H., Lee, Y.K., Kim, M.S., Lee, C.H.** 2012. Detection and molecular characterization of adenoviruses in Korean children hospitalized with acute gastroenteritis. *Microbiology and Immunology*. **56**:523-528.
166. **Moyo, S.J., Hanevik, K., Blomberg, B., Kommedal, O., Nordbø, S.A., Maselle, S., Langeland, N.** 2014. Prevalence and molecular characterisation of human adenovirus in diarrhoeic children in Tanzania; a case control study. *BMC Infectious Diseases*. **14**:1-9.
167. **Li, L., Phan, T.G., Nguyen, T.A., Kim, K.S., Seo, J.K., Shimizu, H., Suzuki, E., Okitsu, S., Ushijima, H.** 2005. Molecular epidemiology of adenovirus infection among pediatric population with diarrhea in Asia. *Microbiology and Immunology*. **49**:121-128.
168. **Verma, H., Chitambar, S.D., Varanasi, G.** 2009. Identification and Characterization of Enteric Adenoviruses in Infants and Children Hospitalized for Acute Gastroenteritis. *Journal of Medical Virology*. **81**:60-64.
169. **Freitas, E.R.L., Borges, A.M.T., Fiaccadori, F.S., Souza, M.B.L.D., Cardoso, D.D.P.** 2010. Molecular characterization of adenovirus detected from fecal samples

obtained from children in the Central West region of Brazil. *Archives of Virology*. **155**:1693-1696.

170. **De Jong, J.C., Wigand, R., Kidd, A.H., Wadell, G., Kapsenberg, J.G., Muzerie, C.J., Wermenbol, A.G., Firtzlaff, R.G.** 1983. Candidate adenoviruses 40 and 41: fastidious adenoviruses from human infant stool. *Journal of Medical Virology*. **11**:215-231.

171. **Jarecki-Khan, K., Tzipori, S.R., Unicomb, L.E.** 1993. Enteric Adenovirus Infection among Infants with Diarrhea in Rural Bangladesh. *Journal of Clinical Microbiology*. **31**:484-489.

172. **Silva, P.A., Stark, K., Mockenhaupt, F.P., Reither, K., Weitzel, T., Ignatius, R., Saad, E., Seidu-Korkor, A., Bienzle, U., Schreier, E.** 2008. Molecular Characterization of Enteric Viral Agents From Children in Northern Region of Ghana. *Journal of Medical Virology*. **80**:1790-1798.

173. **Scott-Taylor, T., Ahluwalia, G., Klisko, B., Hammond, G.W.** 1990. Prevalent Enteric Adenovirus Variant Not Detected by Commercial Monoclonal Antibody Enzyme Immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*. **28**:2797-2801.

174. **Pauly, M., Hoppe, E., Mugisha, L., Petrzalkova, K., Akoua-Koffi, C., Couacy-Hymann, E., Anoh, A.E., Mossoun, A., Shubert, G., Wiersma, L., Pascale, S., Muyembem J., Karhemere, S., Weiss, S., Leendertz, S.A., Calvignac-Spencer, S., Leendertz, F.H., Ehlers, B.** 2014. High prevalence and diversity of species D adenoviruses (HAdV-D) in human populations of four Sub-Saharan countries. *Virology Journal*. **11**:1-9.

175. **Madisch, I., Wölfel, R., Harste, G., Pommer, H., Heim, A.** 2006. Molecular Identification of Adenovirus Sequences: A Rapid Scheme for Early Typing of Human Adenoviruses in Diagnostic Samples of Immunocompetent and Immunodeficient Patients. *Journal of Medical virology*. **78**:1210-1217.

176. **Matsushima Y., Shimizu, H., Phan, T.G., Ushijima, H.** 2011. Genomic characterization of a novel human adenovirus type 31 recombinant in the hexon gene. *Journal of General Virology*. **92**:2770-2775.

177. **Kiulia, N.M., Mwenda, J.M., Nyachio, A., Nyaundi, J.K., Steele, A.D., Taylor, M.B.** 2007. Astrovirus infection in young Kenyan children with diarrhoea. *Journal of Tropical Pediatrics*. **53**:206-209.



178. **Elfving, K., Andersson, M., Msellem, M.I., Welinder-Olsson, C., Petzold, M., Björkman, A., Trollfors, B., Martensson, A., Lindh, M.** 2014. Real-Time PCR Threshold Cycle Cutoffs Help To Identify Agents Causing Acute Childhood Diarrhea in Zanzibar. *Journal of Clinical Microbiology*. **52**:916-923.
179. **Jakab, F., Péterfai, J., Meleg, E., Bányai, K., Mitchell D.K., Szücs, G.** 2005. Comparison of clinical characteristics between astrovirus and rotavirus infections diagnosed in 1997 to 2002 in Hungary. *Acta Pediátrica*. **94**:667-671.
180. **Babkin, I.V.,** Tikunov, A.Y., Zhirakovskaia, E.V., Netesov, S.V., Tikunova, N.V. 2012. High evolutionary rate of human astrovirus. *Infection, Genetics and Evolution*. **12**:435-442.
181. **Simmonds, Peter.** 2006. Recombination and Selection in the Evolution of Picornaviruses and Other Mammalian Positive-Stranded RNA Viruses. *Journal of Virology*. **80**:11124-11140.
182. **Strain, E., Kelley, L.A., Schuktz-Cherry, S., Muse, S.V., Koci, M.D.** 2008. Genomic Analysis of Closely Related Astroviruses. *Journal of Virology*. **82**:5099-5103.
183. **Finkbeiner, S.R., Kirkwood, C.D., Wang, D.** 2008. Complete genome sequence of a highly divergent astrovirus isolated from a child with acute diarrhea. *Virology Journal*. **5**:117.
184. **Ahmed, S.F., Sebeny, P.J., Klena, J.D., Pimentel, G., Mansour, A., Naguib, A.M., Bruton, J., Young, S.Y.N., Holtz, L.R., Wang, D.** 2011. Novel Astroviruses in Children, Egypt. *Emerging Infectious Diseases*. **17**:2391-2393.
185. **Hassine-Zaafraane, M., Sdiri-Loukizi, K., Kaplon, J., Salem, I.B., Pothier, P., Aouni, M., Ambert-Balay, K.** 2013. Prevalence and Genetic Diversity of Norovirus Infection in Tunisian Children (2007–2010). *Journal of Medical Virology*. **85**:1100-1110.
186. **Moyo, S.J., Gro, N., Matee, M.I., kitundu, J., Myrmel, H., Mylvaganam, H., Maselle, S.Y., Langeland, N.** 2011. Age specific aetiological agents of diarrhoea in hospitalized children aged less than five years in Dar es Salaam, Tanzania. *BMC Pediatrics*. **11**:1-6.
187. **Ayukekbong, J., Lindh, M., Nenonem, N., tah, f., Nkuo-Akenji, T., Bergström, T.** 2011. Enteric Viruses in Healthy Children in Cameroon: Viral Load and Genotyping of Norovirus Strains. *Journal of Medical Virology*. **83**:2135-2142.



188. **Japhet, M.O., Adesina, o.A., Famurewa, O., Svensson, L., Nordgren, J.** 2012. Molecular Epidemiology of Rotavirus and Norovirus in Ile-Ife, Nigeria: High Prevalence of G12P[8] Rotavirus Strains and Detection of a Rare Norovirus Genotype. *Journal of Medical Virology*. **84**:1489-1496.
189. **Mattison, K., Sebunya, T.K., Shukla, A., Noliwe, L.N., Bidawid, S.** 2010. Molecular Detection and Characterization of Noroviruses From Children in Botswana. *Journal of Medical Virology*. **82**:321-324.
190. **Colomba, C., Grazia, S., Giammanco, G.M., Saporito, L., Scarlata, F., Titone, L. Arista, T.S.** 2006. Viral gastroenteritis in children hospitalised in Sicily, Italy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. **25**:570-575.
191. **Armah, G.E., Galtimore, C.I., Binka, F.N., Asmah, R.H., Green, J., Ugoji, U., Anto, F., Brown, D.W.G., Gray, J.J.** 2006. Characterisation of Norovirus Strains in Rural Ghanaian Children With Acute Diarrhoea *Journal of Medical Virology*. **78**:1480-1485.
192. **Trainor, E., Lopman, B., Iturriza-Gomara, M., Dove, W., Ngwira, B., Nakagomi, O., Nakagomi, T., Parashar, U., Cunliffe, N.** 2013. Detection and Molecular Characterisation of Noroviruses in Hospitalised Children in Malawi, 1997–2007. *Journal of Medical Virology*. **85**:1299-1306.
193. **Kirby, A., Al-Eryani, A., Al-Sonboli, N., Hafiz, T., Beyer, M., Al-Aghbari, N., Al-Moheri, N., Dove, W., Cunliffe, N.A., Cuevas, L.E.** 2011. Rotavirus and norovirus infections in children in Sana'a, Yemen. *Tropical Medicine and International Health*. **16**:680-684.
194. **Nordgren, J., Kindberg, E., Lindgren, P.E., Matussek, A., Svensson, L.** 2010. Norovirus Gastroenteritis Outbreak with a Secretor-independent Susceptibility Pattern, Sweden. *Emerging Infectious Diseases*. **16**:81-87.
195. **Shirato, H., Ogawa, S., Ito, H., Sato, T., Kameyama, A., Narimatsu, H., Xiaofan, Z., Miyamura, T., Wakita, T., Ishii, K., Takeda, N.** 2008. Noroviruses Distinguish between Type 1 and Type 2 Histo-Blood Group Antigens for Binding. *Journal of Virology*. **82**:10756-10767.
196. **Kubota, T., Kumagai, A., Ito, H., Furukawa, S., Someya, Y., takeda, N., Ishii, k., Wakita, T., Narimatsu, H., Shirato, H.** 2012. Structural Basis for the Recognition of Lewis Antigens by Genogroup I Norovirus. *Journal of Virology*. **86**:11138-11150.

197. **Chan-It, W., Thongprachum, A., Khamrin, P., Kobayashi, M., Okitsu, S., Mizuguchi, M., Ushijima, H.** 2012. Emergence of a New Norovirus GII.6 Variant in Japan, 2008–2009. *Journal of Medical Virology*. **84**:1089-1096.
198. **Eden, J.S., Hewitt, J., Lim, K.L., Boni, M.F., Merif, J., Greening, G., Ratcliff, R.M., Holmes, E.C. Tanaka, M.M., Rawlinson, W.D., White, P.A.** 2014. The emergence and evolution of the novel epidemic norovirus GII.4 variant Sydney 2012. **450**:106-113.
199. **Debbink, K., Lindesmith L.C., Donaldson, E.F., Baric, R.S.** 2012. Norovirus Immunity and the Great Escape. *PLoS Pathogens*. **8**:1-5.
200. **Martella, V., Medici, M.C., Terio, C., Catella, C., Bozzo, G., Tummolo, F., Calderaro, A., Bonura, F., Franco, M., Bányai, k., Giammanco, G.M., Grazia, S.** 2013. Lineage diversification and recombination in type-4 human astroviruses. *Infection, Genetics and Evolution*. **20**:330-335.
201. **Eden, J.S., Tanaka, M.M., Boni, M.F., Rawlinson, W.D., White, P.A.** 2013. Recombination within the Pandemic Norovirus GII.4 Lineage. *Journal of Virology*. **87**:6270-6282.
202. **Santosham, M., Chandran, A., Fitzwater, S., Fischer-Walker, C., Baqui, A. H, Black, R. E.** 2010. Progress and barriers for the control of diarrhoeal disease. *The Lancet*. **376**:63-67.

## *Referências Bibliográficas*

## 6. ANEXOS

### 6.1 Formulário de Informação e de Consentimento Informado

	<p align="center"><b>Informação aos pais e formulário de consentimento livre e esclarecido</b></p> <hr/> <p><b>Epidemiologia da infeção por rotavírus em Huambo, Angola: prevalência da infeção e dos genótipos circulantes</b></p>	 REPÚBLICA DE ANGOLA MINISTÉRIO DA SAÚDE
---	---	---

#### Qual é o problema que queremos estudar?

Durante a consulta o médico diagnosticou Gastroenterite Aguda (GEA) ao seu filho(a). A GEA é frequente nos primeiros anos de vida e é uma importante causa de doença no país. Com este estudo pretendemos saber se a GEA em crianças é causada por dois tipos de vírus: Rotavírus e Norovírus.

#### O que iremos fazer?

Para detetar qual é o vírus causador da doença, será recolhida uma amostra de fezes ao seu filho(a).

A amostra de fezes será analisada da seguinte forma:

1. deteção do rotavírus e/ou norovírus no Laboratório de análises clínicas, do Hospital de Huambo
2. envio da amostra para um laboratório de análises no Instituto de Higiene e Medicina Tropical em Lisboa, para identificação de tipo de rotavírus.

O médico ou enfermeiro irá fazer algumas perguntas sobre a doença do seu filho.

#### Serei obrigado/a a participar na pesquisa?

A participação do seu filho(a) não é obrigatória. Se não quiser participar continuará a ter direito ao tratamento que o médico considerar o melhor. Poderá desistir a qualquer momento.

#### Risco ou benefícios

A participação do seu filho(a) neste estudo não envolve riscos e é grátis.

Não há recompensa em dinheiro para participar. O estudo poderá contribuir para conhecer melhor a doença e ajudar a decidir sobre uma vacina que previna esta infeção em Angola.

#### Confidencialidade

Toda a informação recolhida será mantida secreta (anónima) e apenas o médico e enfermeiro terão acesso aos dados da criança. Os resultados do estudo serão dados ao Hospital de Huambo e às autoridades de saúde, serão apresentados em reuniões científicas e poderão ser publicados.

*Se tiver alguma dúvida, por favor fale com o médico responsável.*

*Contactos do Médico Responsável pelo estudo:*

*Nome:*

*Morada:*

*Telefone:*

*Telefone do gabinete do hospital:*

**DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PAIS / RESPONSÁVEL LEGAL**

- Recebi uma explicação adequada e esclarecida sobre os objetivos e condições do estudo.
- Compreendi que a participação neste estudo é voluntária, poderei retirar o meu consentimento em qualquer altura e tal não afetará os cuidados médicos normais aos quais o meu filho(a) tem direito.
- Dou o consentimento voluntário da participação do meu filho(a) neste estudo

\_\_\_\_\_  
Nome criança, em maiúsculas

\_\_\_\_\_  
Nome do Pai/Mãe/Representante Legal, em maiúsculas

\_\_\_\_\_  
Assinatura/Impressão digital do Pai/Mãe/Responsável Legal



\_\_\_\_\_  
Local e Data

**EQUIPA DE INVESTIGAÇÃO**



- Expliquei aos pais ou representante legal a natureza do estudo.
- Dei uma cópia assinada da *Folha de Informação e Declaração de Consentimento Livre e Esclarecido* aos pais ou representante legal.

\_\_\_\_\_  
Nome do Médico /Enfermeiro do estudo (em maiúsculas)

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Médico /Enfermeiro do estudo

\_\_\_\_\_  
Data

## 6.2 Inquérito Demográfico e Clínico

	<b>Inquérito Epidemiológico - Folha de Trabalho</b>	 REPÚBLICA DE ANGOLA MINISTÉRIO DA SAÚDE
	<b>Epidemiologia da infeção por rotavírus em Huambo, Angola:          prevalência da infeção e dos genótipos circulantes</b>	

**Preencha os espaços com letras MAIÚSCULAS e coloque uma cruz na resposta correta** ☐ **X**

Processo nº \_\_\_\_\_ Código de laboratório \_\_\_\_\_

Nome do local de habitação: \_\_\_\_\_ Concelho \_\_\_\_\_ Local: Cidade ☐ Outra ☐

Idade: \_\_\_\_ (Anos) \_\_\_\_ (Meses) Data de Nascimento \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ (Dia / Mês/ Ano)

Sexo M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>	Peso _____ (Kg)    Altura _____ (cm)    Temperatura _____ °C
	(Z score) Malnutrição: Ausente <input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderada <input type="checkbox"/> Severa <input type="checkbox"/>
	Desidratação: sem desidratação <input type="checkbox"/> ligeira <input type="checkbox"/> moderada <input type="checkbox"/> severa <input type="checkbox"/>
	Estado de atividade da criança: normal <input type="checkbox"/> / reduzido <input type="checkbox"/>

A criança está a ser amamentada: Sim ☐ / Não ☐

Se SIM, durante amamentação comeu outros alimentos: Sim ☐ / Não ☐

A criança sofre de alguma doença crónica? Sim ☐ / Não ☐

Se SIM qual o nome da doença \_\_\_\_\_

Data de início dos sintomas de GEA \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ (Dia / Mês/ Ano)

A criança tem tido febre: Sim ☐ / Não ☐ Duração: \_\_\_\_ dias

A criança tem tido diarreia: Sim ☐ / Não ☐

Se SIM, quantas vezes por dia \_\_\_\_\_ Duração: \_\_\_\_ dias

A criança tem tido vômitos: Sim ☐ / Não ☐

Se SIM, quantas vezes por dia vomita \_\_\_\_\_ Duração: \_\_\_\_ dias

Data de colheita da amostra: \_\_\_\_/\_\_\_\_ (Dia / Mês)

Assinatura do Médico/Enfermeiro/ \_\_\_\_\_

Resultados da análise laboratorial:

<b>Teste Rápido para Rotavírus: Positivo <input type="checkbox"/> / Negativo <input type="checkbox"/> / Inválido <input type="checkbox"/></b> <b>Teste Rápido para Norovírus: Positivo <input type="checkbox"/> / Negativo <input type="checkbox"/> / Inválido <input type="checkbox"/></b>
--

Assinatura do Médico/Técnico do Laboratório \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ (Dia / Mês / Ano)

### 6.3 Escala para Cálculo da Gravidade dos Episódios de GEA

**Tabela 6.1** - Escala para cálculo da gravidade dos Episódios de Gastroenterite, segundo a classificação de Nakagomi *et al.* (Adaptado de (153))

Sinal Clínico/Sintoma	Pontos atribuídos
<b>Diarreia</b>	
Duração (dias)	
<2	1
2-4	2
>4	3
Episódios em 24h	
3	1
4-5	2
>5	3
<b>Ausência de vômitos</b>	0
<b>Vômitos</b>	
Duração (dias)	
1-2	2
≥3	3
Episódios em 24h	
1	1
2	2
≥3	3
<b>Desidratação</b>	
Ausência	0
Presença	2
<b>Febre</b>	
<37.6°C	0
37.6°C - 38.6°C	2
≥38.6°C	3
<b>Atividade</b>	
Normal	0
Reduzida	3



## 6.4 Indicadores de Malnutrição e Relação com a Infecção por Adenovírus, Astrovírus e Norovírus

**Tabela 6.2** Indicadores de malnutrição e relação com a infecção por adenovírus, astrovírus e norovírus, Angola (2012/2013)

Indicadores de Malnutrição	Nº Crianças n=80	Norovírus positivos n=12	<i>p</i> -value*	Grau de Gravidade da diarreia	<i>p</i> -value#	Adenovírus positivos N=11	<i>p</i> -value*	Grau de Gravidade da diarreia	<i>p</i> -value#	Astrovírus positivos N=4	<i>p</i> -value*	Grau de Gravidade da diarreia	<i>p</i> -value#
<b>Peso Vs. Idade</b>													
Z > -2SD	59 (73,8%)	8 (67%)	0,723	8 ± 2,93	0,209	10 (91%)	0,272	6,20 ± 3,39	0,625	2 (50%)	0,281	5 ± 1,41	0,493
-3SD < Z < -2SD	21 (26,2%)	4 (33%)		5,75 ± 2,22		1 (9%)		8		2 (50%)		6,5 ± 2,12	
<b>Altura Vs. Idade</b>													
Z > -2SD	51 (63,8%)	8 (67%)	1,000	6,63 ± 3,07	0,301	6 (55%)	0,515	6,33 ± 3,14	0,975	4 100%	0,291	5,75 ± 1,71	-
-3SD < Z < -2SD	29 (36,2%)	4 (33%)		8,50 ± 2,08		5 (45%)		6,40 ± 3,78		0 (0%)		0	
<b>Peso Vs. Altura <sup>a)</sup></b>													
Z > -2SD	57 (73,1%)	7 (64%)	0,475	8,71 ± 2,29	0,066	10 (91%)	0,271	6,20 ± 3,39	0,625	2 (50%)	0,292	5 ± 1,41	0,493
-3SD < Z < -2SD	21 (26,9%)	4 (36%)		5,75 ± 2,22		1 (9%)		8		2 (50%)		6,5 ± 2,12	

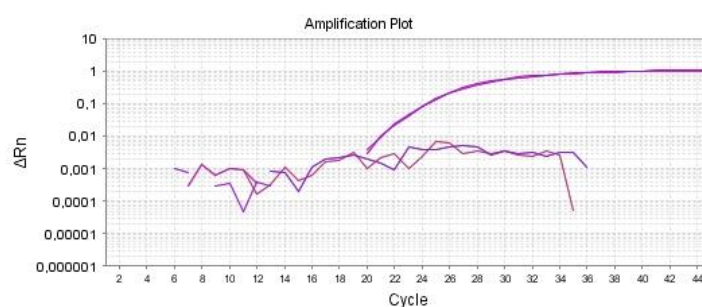
a) Dos 108 inquéritos, havia informação de 80 inquéritos para os indicadores de malnutrição pesos Vs idade, e altura Vs idade. Para a variável peso Vs altura existiam 78 inquéritos.

\*Teste de Fisher e #T Student

## 6.5 Resultados de rt- RT PCR para Norovírus

**Tabela 6.3** - Amostras positivas por rt-RT PCR para norovírus. Determinação do genótipo, e valor Ct.

Amostra	Genogrupo	Ct
AH8	GII	27
AH14	GII	37
AH15	GII	29
B8	GII	22
B15	GII	30
B27	GII	35
B30	GII	29
C26	GII	31
C36	GII	37
C38	GI	22
C56	GI	34
C62	GI	27
C71	GII	31
C83	GI	25
C93	GII	24
C95	GI	37
C97	GII	33
CAL2	GI	25
M5	GII	31
M10	GI	34
M11	GII	32
M17	GII	26
M22	GII	33
M43	GII	31
M46	GII	26
M47	GII	36
M48	GII	35
M55	GII	34
CSMI13	GII	34
HMC25	GII	27
HMC40	GII	33
HMC41	GII	36
HMC42	GII	22
HMC43	GII	35
CSP1	GII	31
CSP3	GII	20
CSP11	GII	31



**Figura 6.1** Resultado de rt-RT-PCR para a amostra B8. No gráfico é possível identificar as duas réplicas. A amostra apresentou um Ct de 22.

## 6.6 Relação das Características Demográficas, Alimentares e Clínicas com a Infecção por Adenovírus, Astrovírus e Norovírus, em Angola (2012/2013)

**Tabela 6.4** Relação das Características Demográficas, Alimentares e Clínicas com a Infecção por Adenovírus, Astrovírus e Norovírus, em Angola (2012/2013)

Varáveis	Categorias	Nº HAdV + n=17 (%)	<i>p</i> - <i>value</i>	Nº NoV + n=17 (%)	<i>p</i> - <i>value</i>	Nº HAstV + n=4 (%)	<i>p</i> - <i>value</i>
Características Demográficas							
Género (n=103)	Masculino	4 (23,5)	0,006	6 (40)	0,263	1 (25)	0,322
	Feminino	13 (76,5)		9 (60)		3 (75)	
Idade (n=108)	0-24	16 (94,1)	1,000	14 (82,4)	0,374	3 (75)	0,353
	>24	1 (5,9)		3 (17,6)		1 (25)	
Local de Residência (n=105)	Urbano	13 (81,3)	1,000	13 (86,7)	0,511	3 (75)	1,000
	Rural	3 (18,8)		2 (13,3)		1 (25)	
Características da Alimentação							
Amamentação (n=107)	Sim	12 (70,6)	0,762	12 (70,6)	0,762	3 (75)	1,000
	Não	5 (19,4)		5 (29,4)		1 (25)	
Se sim, durante a amamentação ingeriu outros alimentos? (n=51)	Leite materno e outros alimentos	7 (100)	0,579	7 (87,5)	1,000	1 (100)	1,000
	Amamentação exclusiva	0		1 (12,5)		0	
Características Clínicas							
Febre (n=93)	<37,6°C	11 (91,7)	1,000	11 (100)	0,350	4 (100)	1,000
	≥37,6°C	1 (8,3)		0		0	
Se ≥37,6°C, duração média (dias)		2,5	0,934	-	0,845	-	0,969
Diarreia							
Duração média (dias)		3,1	0,536	2,7	0,145	4,7	0,297
Nº vezes/24horas (média)		3,8	0,390	3,9	0,199	3,8	0,687
Vómitos (n=103)	Sim	6 (35,3)	0,436	7 (43,8)	1,000	2 (50)	1,000
	Não	11 (64,7)		9 (56,3)		2 (50)	
Duração média (dias)		2	0,436	1,9	0,221	3,5	0,341

Nº vezes/24horas (média)		2	0,424	2,9	0,465	5	0,091
Desidratação (n=101)	Sim	5 (19,4)	0,182	8 (50)	0,791	1 (33,3)	1,000
	Não	12 (70,6)		8 (50)		2 (66,7)	
Atividade (n=103)	Normal	13 (76,5)	1,000	12 (75)	1,000	4 (100)	0,570
	Reduzida	4 (23,5)		4 (25)		0	
Malnutrição (n=97)	Sim	4 (28,6)	1,000	5 (33,3)	0,755	4 (100)	0,573
	Não	10 (71,4)		10 (66,7)		0	
Índice de Massa Corporal (média)		15,4±2,8	0,512	14,7±3,8	0,206	14,9±4,5	0,547
Grau de Gravidade da diarreia <sup>a)</sup> (média)		5,71±3,1	0,215	6,59±3,1	0,878	5,75±1,7	0,592

## 6.7 Resultados Preliminares Obtidos por BLAST, após Sequenciação dos Produtos Amplificados do Gene do Hexão de Adenovírus

Amostra	primer	Genótipo AdV (BLAST)	Corte (nt)	Tamanho (pb)	Referência	ID	Query
AH8	GT2F	HAdV-40	18-739	721	AB330121	100	100
					FJ228470	99	68
B4	GT2F	HAdV-40	24-735	711	AB330121	99	100
					FJ228470	99	68
B25	GT2F	HAdV-41	37-742	706	HQ005281	98	100
					KF303071	99	100
B34	GT2F	HAdV-40	26-731	706	AB330121	100	100
					FJ228470	99	68
B38	GT2F	HAdV-41	28-730	703	KF303071	98	100
					HQ005281	99	100
B39	GT2F	HAdV-27	32-753	722	AB330108	99	100
					JN226753	99	100
CAL3	GT2F	HAdV-61/ HAdV-8	25-714	689	JF964962	98	100
					AB330093	83	100
CSMI 13	GT2F	HAdV-26	132-769	637	AB330107	99	100
					EF153474	99	100
CSP 5	GT2F	HAdV-18	295-747	452	GU191019	89	99
					AB330099	89	99
CSP 9	GT2F	HAdV-5	48-836	788	KC570899	99	100
					FJ943602	99	99
CSP 11	GT2F	HAdV-29/ HAdV-15	90-764	674	JN226754	100	100
					JN226448	100	100
CSP 21	GT2F	HAdV-1	59-765	705	KC570885	99	99
					JX173080	99	99
CIII4	GT2F	HAdV-1	28-783	754	KC570885	99	100
					JX173080	99	100
HMC 2	GT2F	HAdV-2	289-647	352	JX173079	100	100
					JQ796055	100	100
HMC 8	GT2F	HAdV-41	282-695	414	DQ315364	100	100
					AB330122	100	100

<b>HMC 11</b>	GT2F	HAdV-9	133-738	606	AB330090	96	100
					AJ854486	96	100
<b>HMC 15</b>	GT2F	HAdV-41	98-702	604	DQ315364	99	100
					AB330122	99	100
<b>HMC 17</b>	GT2F	HAdV-41	115-681	566	DQ315364	99	100
					AB330122	99	100
<b>HMC 22</b>	GT2F	HAdV-26	127-743	616	AB330107	99	100
					DQ149624	99	100
<b>HMC 28</b>	GT2F	HAdV-41	63-721	658	DQ315364	100	100
					AB330122	100	100
<b>M8</b>	GT2F	HAdV-40	25-701	676	FJ228470	99	67
					AB330121	100	100
<b>M11</b>	GT2F	HAdV-1	58-677	620	KC570885	99	100
					JX173080	99	100
<b>M29</b>	GT2F	HAdV-1	57-663	605	KC570885	98	100
					JX173080	98	100
<b>M57</b>	GT2F	HAdV-41	30-644	614	AB610520	100	100
					HQ005288	100	100

## 6.8 Resultados Preliminares Obtidos por BLAST, após Sequenciação dos Produtos Amplificados do gene RdRp e da região ORF2 de astrovírus

Amostra	primer	Genótipo AstV (BLAST)	Corte	Tamanho (pb)	Referência	ID	Query
Região Amplificada: ORF1b							
B19	panAV-R1	HAstV-1	36-365	330	GQ441163	97	96
					FJ375759	94	97
B20	panAV-R1	HAstV-1	38-366	328	AB308374	98	100
					KC342249	96	100
B23	panAV-R1	HAstV-1	34-364	331	GQ441163	98	97
					KC342249	95	98
C31	panAV-R1	HAstV-1	32-362	331	AB308374	98	98
					KC342249	97	98
CSP17	panAV-R1	HAstV-1	40-376	337	AB308374	96	99
					KC342249	95	99
HMC8	panAV-R1	HAstV-2	35-367	333	FJ842147	97	96
					KF039911	96	95
M36	panAV-R1	HAstV-1 / 2	30-373	344	KF039910.1 (2)	98	99
					AY720891 (1)	94	98
M47	panAV-R1	HAstV-1	35-369	335	AB308374	96	97
					KC342249	98	97
Região Amplificada: ORF2							
B19	Mon 69	HAstV-3	58-422	365	JN871262	97	100
					KC896091	97	100
B20	Mon 69	HAstV-1	47-412	366	JN87125	99	100
					AB548401	99	98
B23	Mon 69	HAstV-3	70-421	352	JN871262	98	100
					KF668570	97	98
C31	Mon 69	HAstV-1	45-413	369	JN87125	97	100
					JF327666	98	98
CSP17	Mon 69	HAstV-5	30-421	392	JF929196	97	99
					JQ403108	97	100
M36	Mon 69	HAstV-5	71-422	352	U15131	95	100
					AB000297	95	100
M47	Mon 69	HAstV-5	40-427	388	JQ403108	98	100
					JF929196	98	99

## 6.9 Resultados Preliminares Obtidos por BLAST e RIVM após Sequenciação dos Produtos Amplificados da região NS da ORF2 de norovírus

Amostra	<i>primer</i>	Genótipo NoV (BLAST)	Corte	Tamanho (pb)	Ref.	ID	<i>Query</i>	Genótipo Nov (RIVM)	Ref.
Genogrupo I									
C38	NVG1	GI.3	42-350	309	JN699050	95	99	GI.3	U04469
					KF361441	94	100		GQ856473
C56	NVG1	GI.5	37-356	319	KJ402295	94	99	GI.5	M87661
					JN191360	95	92		L23828
C62	NVG1	GI.3	37-349	313	JX416392	97	100	GI.3	U04469
					HQ213844	95	100		GQ856473
C83	NVG1	GI.3	40-348	309	JX416392	97	100	GI.3	AJ277612
					HQ213844	96	100		AY038598
CAL2	NVG1	GI.3	18-344	327	JX416392	97	95	GI.3	AJ277612
					HQ213844	96	95		AY038598
M10	NVG1	GI.3	65-350	269	JX416392	97	75	GI.3	EF547396
					AB058529	97	99		GQ856471
Genogrupo II									
AH8	G2SKF	GII.6	30-328	298	KF279386	94	96	GII.6	AJ277620
					JN699041	95	97		AB039778
AH14	G2SKF	GII.7	27-321	295	AB453773	99	92	GII.7	AF414409
					KC495652	98	96		AJ277608
AH15	G2SKF	GII.7	20-335	316	AB453773	95	87	GII.7	AF414409
					KC495652	97	91		AJ277608
B8	G2SKF	GII.16	27-310	284	JX416400	96	93	GII.16	AY502010
					GU138769	96	88		GQ856476
B15	G2SKF	GII.2	23-338	316	AB662854	96	93	GII.2	X81879
					KF279385	95	93		AY134748
B27	G2SKF	GII.3	42-424	306	EU249137	97	98	GII.3	EU187437



					KC4956 60	96	98		U02030
<b>B30</b>	G2SKF	GII.6	31-310	280	KF4343 05	94	99	GII.6	AJ277620
					JN69904 1	96	97		AB039778
<b>C26</b>	G2SKF	GII.4	20-312	293	KF4759 35	98	100	GII.4	X76716
					KC4956 85	98	99		AB542917
<b>C36</b>	G2SKF	GII.4	28-315	288	KJ41579 0	97	100	GII.4	X76716
					KC4956 85	97	98		AB542917
<b>C71</b>	G2SKF	GII.4 (Sydney_2 012)	23-304	282	KF0082 41	99	98	GII.4 (Sydney_2 012)	X76716.1
					KF3787 31	99	98		AB542917
<b>C93</b>	G2SKF	GII.6	24-315	292	JN69904 1	96	96	GII.6	AJ277620
					KF4343 05	95	100		AB039778
<b>C97</b>	G2SKF	GII.7	30-418	389	AB4537 73	98	71	GII.7	AF414409
					KC4956 52	98	74		AJ277608
<b>CSMI13</b>	G2SKF	GII.4	32-336	304	KF2750 24	98	93	GII.4 (Sydney_2 012)	X76716
					KF0082 41	99	88		AB542917
<b>CSP1</b>	G2SKF	GII.9	29-311	283	EF6305 30	97	96	GII.9	AY03859 9
					AB5145 99	97	92		DQ37971 5
<b>CSP3</b>	G2SKF	GII.4	20-313	293	KF2750 21	99	97	GII.4 (Sydney_2 012)	X76716
					KF2750 24	99	98		AB542917
<b>CSP11</b>	G2SKF	GII.3	21-314	294	KC4956 60	96	100	GII.3	EU187437
					KC4956 59	96	100		U02030
<b>HMC25</b>	G2SKF	GII.4 (Sydney_2 012)	19-316	298	KF0082 41	99	94	GII.4 (Sydney_2 012)	X76716
					KF2750 24	98	97		AB542917
<b>HMC40</b>	G2SKF	GII.7	19-311	293	KC4956 62	98	100	GII.7	AF414409
					AB2583 31	97	94		AJ277608
<b>HMC41</b>	G2SKF	GII.6	42-355	313	KF2793 86	95	88	GII.6	AJ277620
					AB5391 49	98	79		AB039778
<b>HMC42</b>	G2SKF	GII.6	24-311	288	KF2793 86	97	100	GII.6	AJ277620
					AB5391 49	98	92		AB039778
<b>HMC43</b>	G2SKF	GII.7	23-480	458	AB2583 31	97	74	GII.7	AF414409
					KF8465 29	97	74		AJ277608

<b>M5</b>	G2SKF	GII.1	27-311	284	KC9624 59	98	99	GII.1	AJ277606
					KF4759 28	97	100		U07611
<b>M11</b>	G2SKF	GII.6	48-346	259	JX89889 0	99	100	GII.6	AJ277620
					KC4956 84	99	100		AB039778
<b>M17</b>	G2SKF	GII.7	25-297	272	AB4537 73	99	98	GII.7	AF414409
					JQ75104 3	99	98		AJ277608
<b>M22</b>	G2SKF	GII.6	21-302	282	KF4343 05	95	99	GII.6	AJ277620
					JN69904 1	94	100		AB039778
<b>M43</b>	G2SKF	GII.4	30-366	336	KJ68541 4	99	92	GII.4	X76716
					JX98907 4	99	92		AB542917
<b>M46</b>	G2SKF	GII.6	28-294	267	JN69904 1	94	100	GII.6	AJ277620
					KF4343 05	93	100		AB039778
<b>M47</b>	G2SKF	GII.4	31-299	269	KJ68541 4	99	100	GII.4	X76716.1
					JX98907 4	99	100		AB542917
<b>M48</b>	G2SKF	GII.14	23-304	281	JX89616 1	98	100	GII.14	GQ85646 5
					JF90905 4	97	96		AY13076 1
<b>M55</b>	G2SKF	GII.6	25-332	308	KC4956 84	99	93	GII.6	AJ277620
					JX89889 0	99	89		AB039778

## 6.10 Relação das Características Alimentares e Clínicas com a Infecção por Adenovírus e Norovírus

**Tabela 6.5** Relação das Características Alimentares e Clínicas com a Infecção por Adeno e Norovírus, em Angola (2012/2013)

Varáveis	Categorias	HAdV-40 e -41 (n=7)	HAdV não 40 e -41 (n=10)	<i>p</i> - <i>value</i>	NoV GII.4 (n=4)	NoV não GII.4 (n=12)	<i>p</i> - <i>value</i>
Características da Alimentação							
Amamentação	Sim	5	2	0,686	4	8	0,272
	Não	2	3		0	4	
Se sim, durante a amamentação ingeriu outros alimentos?	Leite materno e outros alimentos	5	8	0,400	4	7	0,462
	Amamentação exclusiva	2	1		0	2	
Características Clínicas							
Febre	<37,6°C	6	5	0,500	3	8	-
	≥37,6°C	0	1		-	-	
Se ≥37,6°C, duração média (dias)		-	2	-	-	-	-
Diarreia							
Duração média (dias)		2,71 ± 0,76	3,43 ± 1,13	0,191	3 ± 1,63	2,73 ± 1,27	0,737
Nº vezes/24horas (média)		3,71 ± 1,11	3,78 ± 0,83	0,898	3,50 ± 1,29	3,91 ± 1,36	0,736
Vômitos	Sim	4	2	0,145	1	5	0,462
	Não	3	8		3	6	
Duração média (dias)		2,25 ± 1,26	1	0,440	1	2,20 ± 1,30	0,448
Nº vezes/24horas (média)		2,25 ± 1,26	1,50 ± 0,71	0,492	4	2,20 ± 1,10	0,208
Desidratação	Sim	2	3	0,686	2	6	0,554
	Não	5	7		1	6	
Atividade	Normal	4	9	0,162	2	9	0,637
	Reduzida	3	1		1	3	
Malnutrição	Sim	2	2	0,594	0	3	0,110
	Não	4	6		2	9	
Índice de Massa Corporal (média)		15,2 ± 3,66	15,7 ± 1,76	0,787	13,1 ± 0,28	15,1 ± 4,14	0,534
Grau de Gravidade da diarreia <sup>a)</sup> (média)		7,43 ± 3,10	4,50 ± 2,51	0,048	6,25 ± 2,06	6,58 ± 3,50	0,861



